

Medizinische Fakultät der Universität Rostock

Institut für Anatomie

Prof. Dr. med. Andreas Wree

**Rezeptordichten acetylcholinerg und glutamerger
Rezeptoren im 6-OHDA-Hemiparkinson-Modell der Ratte
nach intrastriataler Botulinum-Neurotoxin-A-Injektion**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Zahnmedizin

der Universität Rostock

vorgelegt von

Melanie Scheel, geb. am 07.10.1995 in Pritzwalk

aus Rostock

Rostock, den 20. Mai 2019

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002848

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Wree (Seniorprofessor am Institut für Anatomie, Medizinische Fakultät der Universität Rostock)
E-Mail: andreas.wree@med.uni-rostock.de

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. Karl Zilles (JARA-Seniorprofessor am Institut für Neurowissenschaften und Medizin (INM-1), Forschungszentrums Jülich)
E-Mail: k.zilles@fz-juelich.de

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Alexander Storch (Klinikdirektor in der Klinik und Poliklinik für Neurologie)
E-Mail: alexander.storch@dzne.de

Datum der Eröffnung des Promotionsverfahren: 24. Juni 2019

Datum der Verteidigung: 3. März 2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....VIII

1. Einleitung 1

1.1 Das idiopathische Parkinson-Syndrom..... 1

1.1.1 Symptome 1

1.1.2 Stadien des idiopathischen Parkinson-Syndroms 2

1.1.3 Therapie des Parkinson-Syndroms 4

1.2 Extrapiramidalmotorisches System, Basalganglien und ihre Rolle beim Parkinson..... 6

1.3 BoNT-A und seine bisherige Anwendung zur Therapie von Erkrankungen..... 11

1.4 Acetylcholinerge Rezeptoren, ihre Bedeutung und die verwendeten Liganden 14

1.4.1 Nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor 14

1.4.2 Muskarin-Rezeptor 1 17

1.4.3 Muskarin-Rezeptor 2 19

1.4.4 Muskarin-Rezeptor 3 21

1.5 Glutamerge Rezeptoren, ihre Bedeutung und die verwendeten Liganden 23

1.5.1 NMDA-Rezeptor..... 23

1.5.2 mGlu 2/3-Rezeptor..... 25

1.5.3 Kainat-Rezeptor 27

1.6 Tiermodell 29

1.7 Fragestellung 31

2. Material und Methoden 33

2.1 Versuchstiere und Tierhaltung..... 33

2.2 Unilaterale Injektion des 6-OHDA 34

2.3 Intrazerebrale Applikation von BoNT-A..... 34

2.4 Gewebeaufarbeitung 35

2.5 *in vitro* Rezeptorautoradiographie 35

2.6 Daten- und Bildverarbeitung 37

Inhaltsverzeichnis

2.7 Statistik	41
3. Ergebnisse	42
3.1 Qualitative Betrachtung der Ergebnisse der Autoradiographie	42
3.2 Quantitative Betrachtung der Rezeptordichten für acetylcholinerge Rezeptoren	44
3.2.1 nAch-Rezeptor ($[^3\text{H}]$ -Epibatidin).....	44
3.2.2 M_1 -Rezeptor ($[^3\text{H}]$ -Pirenzipin).....	47
3.2.3 M_2 -Rezeptor ($[^3\text{H}]$ -Oxotremorin-M)	50
3.2.4 M_2 -Rezeptor ($[^3\text{H}]$ -AF-DX 384).....	53
3.2.5 M_3 -Rezeptor ($[^3\text{H}]$ -4-Damp)	56
3.3. Quantitative Betrachtung der Rezeptordichten für glutamerge Rezeptoren.....	59
3.3.1 Kainat-Rezeptor ($[^3\text{H}]$ -Kainat).....	59
3.3.2 mGlu 2/3-Rezeptor ($[^3\text{H}]$ -LY 341/495)	62
3.3.3 NMDA-Rezeptor ($[^3\text{H}]$ -MK-801)	65
4. Diskussion	68
4.1 Beurteilung des Nutzens des Tiermodells	68
4.2 Rezeptordichten der LV Ratten für acetylcholinerge Rezeptoren.....	69
4.3 Rezeptordichten der LV Ratten für glutamerge Rezeptoren	79
4.4 Rezeptordichten der LB Ratten für acetylcholinerge Rezeptoren	85
4.5 Rezeptordichten der LB Ratten für glutamerge Rezeptoren	89
4.6 Therapeutisches Potential der intrastriatalen BoNT-A-Injektion.....	92
4.7 Evaluierung der Methode	93
4.8 Ausblick.....	94
5. Zusammenfassung.....	95
6. Literaturverzeichnis.....	97
6.1 Tabellenverzeichnis	110
6.2 Abbildungsverzeichnis	110
7. Anhang	I

Inhaltsverzeichnis

7.1 Tabellenanhang.....	I
7.2 Abbildungsanhang.....	XI
Erklärung.....	XXI
Thesen.....	XXIII
Danksagung.....	XXV
Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
6-OHDA	6-Hydroxydopamin (OH = Hydroxygruppe)
AcB	Nucleus accumbens
Ach	Acetylcholin
BoNT-A	Botulinum Neurotoxin-A
CA1/3	Teilregionen im Hippocampus
Ca ²⁺	Kalzium
CG	Cingulärer Kortex
CPu	Caudatus-Putamen-Komplex
DG	Gyrus dentatus
EPMS	Extrapyramidalmotorisches System
Fr	Fasciculus retroflexus (Meynert-Bündel)
GP	Globus pallidus
KG	Körpergewicht
LB	Versuchsgruppe der läsionierten und mit BoNT-A behandelten Ratten
LBD	Lewy-Körperchen-Demenz
LHb	Laterale Habenularkomplex
LV	Versuchsgruppe der läsionierten und mit Vehikellösung scheinbehandelten Ratten
M	Motorischer Kortex
mAch-Rezeptor	Muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor
mGlu 2/3	Metabotrope Glutamatrezeptoren 2 und 3
MHb	Mediale Habenularkomplex
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
M-Rezeptor	Muskarin-Rezeptor
MVB	Mediale Vorderhirnbündel
nAch-Rezeptor	Nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	Phosphatpufferlösung
RD	Rezeptordichte
S	Somatosensorischer Kortex
SN (pc, pr)	Substantia nigra (Pars compacta, Pars reticularis)
STN	Nucleus subthalamicus
VTA	Ventrales tegmentales Areal

1. Einleitung

1.1 Das idiopathische Parkinson-Syndrom

1.1.1 Symptome

Morbus Parkinson (MP), auch als "Schüttellähmung" (shaking palsy nach James Parkinson) oder die Parkinson-Krankheit (nach Marie Charcot) bekannt, ist keine seltene Krankheit. Schätzungsweise 300.000 in Deutschland lebende Menschen leiden an MP. Dabei steigt die Häufigkeit der Erkrankung mit dem Alter. 1-2% aller über 50-Jährigen und 3% aller über 80-Jährigen sind betroffen. Von allen Betroffenen ist aber schon jeder vierte vor dem 50. Lebensjahr erkrankt und bis zu 10% haben noch nicht einmal das 40. Lebensjahr erreicht (Gerlach et al., 2003; Trenkwalder et al., 2011).

Die häufigste Form des MP ist der idiopathische (primäre) Typ (75% aller Erkrankten). Daneben gibt es weitere Untergruppen, wie den symptomatischen (sekundären), den Toxin-induzierten (meist durch Kohlenmonoxid ausgelöst), den familiär vererblichen ("Parkinson mit Beginn vor dem 50. Lebensjahr") und den vaskulären Typ. Weiterhin werden die sogenannten atypischen Parkinson-Syndrome (diese entstehen durch neurodegenerative Erkrankungen) von den normalen Syndromen (wie beim idiopathischen Typ) getrennt. Im einzelnen handelt es sich dabei um: Multisystematrophie, progressive Supranukleäre Blickparese, kortikobasalganglionäre Degeneration, Lewy-Körperchen-Demenz (LBD), Normaldruck-Hydrozephalus und medikamenteninduzierte Syndrome (Trenkwalder et al., 2011).

Frühe Anzeichen, die auf MP aufmerksam machen können und in den letzten Jahren bekannt geworden sind, sind u.a. das verminderte Riechvermögen, Traumschlaf-Verhaltensstörungen (auch bekannt als "REM-Sleep-Behavior-Disorder"), Blutdruckregulationsstörungen (tageszeitlich starke Schwankungen), Verdauungsstörungen (längeres Verweilen von Speisen und Medikamenten im Magen), Mundtrockenheit sowie Sehstörungen (z.B. verschwimmen der Buchstaben beim Lesen). Der idiopathische MP ist neben den Frühsymptomen besonders gekennzeichnet durch 4 Kardinalsymptome: den Rigor (Muskelsteifigkeit), den Tremor (das typische Zittern, dem die Krankheit auch ihren Namen verdankt), der Bradykinese (Bewegungsabläufe werden verlangsamt initiiert und ausgeführt) und der posturale Instabilität (Geh- und Haltungsstörung, Schluckstörungen). Auch wird hierbei eine vorn über gebeugte

Haltung des Oberkörpers zu den wichtigen Symptomen der Krankheit gezählt (Oertel et al., 2011; Trenkwalder et al., 2011).

Neben Computertomografie, MRT, Riechtest und dem Schlaflabor, gehört die Sonografie der Substantia nigra (SN) zu den wichtigsten Methoden MP zu diagnostizieren. Grund dafür ist der auftretende Verlust von dopaminergen Nervenzellen in der SN bei MP, welcher neuroanatomisch von zentraler Bedeutung ist. Der Untergang dieser Zellen sorgt dafür, dass die SN eines Erkrankten im Schnittbild keine charakteristische schwarze Linie mehr aufweist, die bei Normalen durch den hohen Neuromelanin-Gehalt der dopaminergen Neurone entsteht. Motorische Symptome bei MP treten erst dann in Erscheinung, wenn etwa 70-80% der dort befindlichen Neurone zugrunde gegangen sind (Gerlach et al., 2003; Trenkwalder et al., 2011).

Da die SN Bestandteil der Basalganglienschleife ist, wirkt sich der hier entstehende Dopamin-Mangel auch auf weitere Neurone aus, wie die cholinergen Interneurone oder GABAergen Neurone. Dies führt zu weit reichenden Störungen in den komplexen Schaltkreisen der Basalganglien. Hier wird insbesondere durch den Mangel an Dopamin der Globus pallidus (GP) medialis vermehrt aktiviert, der wiederum vom motorischen Kortex gesteuerte Bewegungsabläufe hemmt und somit Grund für das Symptom der Bradykinese ist (Obeso et al., 2008a, 2008b).

Weiterhin sind für die Diagnose des MP der Nachweis von Lewy-Körperchen in der SN von Bedeutung, die u.a. für das atypische Syndrom des MP, der Lewy-Körperchen-Demenz, verantwortlich sind. Diese Proteinkonglomerate (bestehend u.a. aus α -Synuclein, Ubiquitin, Neurofilamenten) sind ausschließlich in der SN bei MP Erkrankten zu finden. Sie helfen bei Forschungen im post mortem Material der Ursache dieser Krankheit näher zu kommen und dienen auch dazu, die Stadien nach Braak für MP zu differenzieren (Gerlach et al., 2003; Jellinger, 2009).

1.1.2 Stadien des idiopathischen Parkinson-Syndroms

Um den Grad der Erkrankung bei MP zu klassifizieren, hat Heiko Braak die Krankheit in 6 Stadien eingeteilt, die sogenannten Braak-Stadien (Braak-Stages, 2003). Die frühen Stadien beschreiben nicht-motorische Störungen, wie Geruchswahrnehmungsstörungen, Schlafstörungen und Verdauungsprobleme. Motorische Symptome werden in den mittleren Stadien aufgeführt und kognitive Störungen betreffen erst die letzten Stadien der Krankheit. Braak et al. stellen zudem mit der "Dual-Hit"-Theorie eine Hypothese zum Ursprung der

Einleitung

Krankheit auf. Demnach soll ein potentieller Erreger den menschlichen Organismus über 2 Eintrittspforten betreten. Zum einen über die Nase (1. Pforte) und von dort kann er dann über den Speichel in den Magen-Darm-Trakt (2. Pforte) gelangen. Vom enterischen System aus gelangt die Noxe dann weiter in das vegetative Nervensystem und dringt via retrograden Transport über den Nervus vagus zu den unteren Teilen des Hirnstamms vor. Zum anderen kann der Erreger auch direkt über den Riechnerv das Riechzentrum des Gehirns befallen, was zu einem multiplen Befall des Gehirns führt. Beide Versionen dienen als Ausgangspunkt für Stadium 1 (Braak et al., 2003; Hawkes et al., 2007, 2009; Trenkwalder et al., 2011).

Das erste Stadium beschreibt den Beginn der Krankheit im unteren Hirnstamm und dem olfaktorischen System. Hier klagen Betroffene nur über oben benannte nicht-motorische Störungen. Mittels eines Riechtest unter Verwendung des OEP (olfactory evoked response potential) lassen sich frühe Anzeichen des MP identifizieren (Hawkes & Shephard, 1998). Im zweiten Stadium dringt die Noxe weiter bis zu den Raphe-Kernen und den retikulären Kernen der Medulla oblongata vor. Während im ersten Stadium noch Lewy-Neuriten überwogen, wurden sie in diesem Stadium durch Lewy-Körperchen übertroffen. Diese Lewy Körperchen/-Neuriten liegen in Kerngebieten wie den Nucleus olfactorius anterior oder den Nucleus vagalis anterior und sind mit an den Effekten des Parasympathikus und Sympathikus des menschlichen Organismus beteiligt. Zudem stellte Braak in seinen Studien fest, dass diese Proteinkonglomerate auch im Auerbach-Plexus des Ösophagus und Meissner-Plexus des Magens zu finden sind und für die beim MP auftretenden Schluck- und Verdauungsprobleme verantwortlich sind (Hawkes et al., 2007, 2009).

Zu Beginn des dritten Stadiums hat die Krankheit bereits die SN pars compacta (pc) erreicht, jedoch ohne dopaminerge Neuronen zu zerstören. Später ist auch der Nucleus basalis Meynert betroffen, eine Region mit vielen acetylcholinhaltigen Neuronen.

Ab Stadium 4 ist auch der Meso- und Allokokortex beteiligt. Hier beginnt die Zerstörung dopaminerger Neurone. Auch wird eine signifikante Zerstörung des Nucleus olfactorius anterior verzeichnet. Es beginnen sich motorische Symptome zu manifestieren.

Im vorletzten Stadium werden schon Teile des Neokortex befallen, dies betrifft den Temporal-, Parietal- und Frontallappen.

Mit dem 6. Stadium erreicht die Krankheit ihre schwerste Stufe. Hier umfasst sie den gesamten Neokortex mitsamt der motorischen und sensorischen Areale (Braak et al., 2003; Hawkes et al., 2007, 2009, Obeso et al., 2008a, 2008b) (Braak-Stadien siehe Abbildung 1).

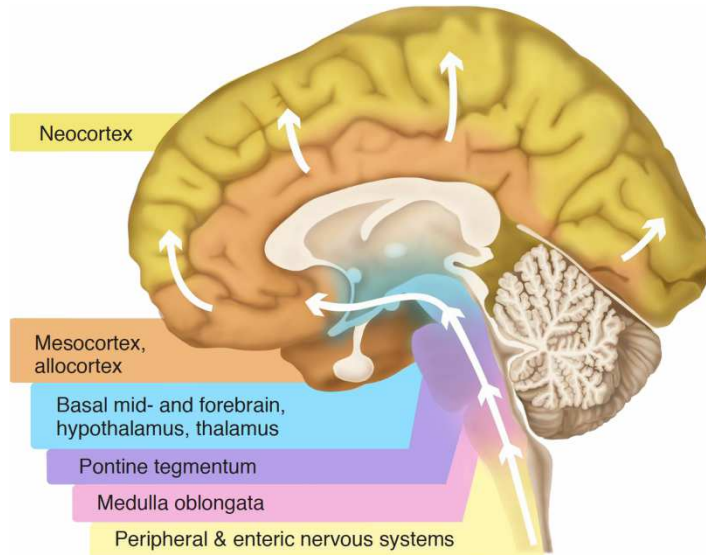


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Ausbreitung der Parkinson-Krankheit nach Braak

Die rosa und lila Region beschreibt die Stadien 1-2, die hellblaue Region die Stadien 3-4, die braune Region Stadium 5 und die gelbe Region die Ausbreitung der Noxe über den gesamten Cortex und damit Stadium 6. Es wird vermutet, dass die Krankheit in der Peripherie beginnt und durch retrograden Transport entlang von Projektionsneuronen aus dem Gastrointestinal-Trakt Zugang zum ZNS erhält. Wenn die Krankheit fortschreitet, steigt die Schwere der Läsionen in den anfälligen Regionen (Visanji et al., 2013).

1.1.3 Therapie des Parkinson-Syndroms

Therapiemöglichkeiten, die bis heute bekannt sind, werden nach Pharmakotherapien sowie nicht medikamentösen Therapien unterteilt. Dabei gibt es Unterschiede in der Therapie der frühen Phase der Erkrankung bis zur Spätphase.

Eine naheliegende medikamentöse Therapie ist die Substitution des fehlenden Dopamins. Dies erfolgt über Levodopa (L-Dopa), einer chemischen Vorstufe des menschlichen Dopamins, welches die Blut-Hirn-Schranke passieren kann. Dieses Medikament wird in Form von Tabletten oder über Infusionsvorrichtungen (z.B. Magensonde) verabreicht. L-Dopa wird im Gehirn zum wirksamen Dopamin umgewandelt. Es besteht bei Einnahme bereits nach 20-30 Minuten eine deutliche Verbesserung der idiopathischen Symptome dieser Erkrankung. Da aber MP nicht allein aus dem Untergang dopaminerger Neurone resultiert, sondern diese nur die späteren Symptome auslösen, wird damit letztendlich keine Heilung mehr erzielt. In der ersten Zeit der Behandlung mit L-Dopa (der sogenannten Honeymoon-Phase) vertragen die

Einleitung

Patienten das Medikament sehr gut und es wird bei vergleichsweise geringen Nebenwirkungen eine hohe Wirksamkeit erzielt (Gerlach et al., 2003). Nach Jahren der Behandlung mit L-Dopa kann es aber zu "Spätkomplikationen" kommen, da die Bindungsstellen für Dopamin empfindlicher werden und das Gehirn weniger Dopamin speichern kann (Problem von MP im Spätstadium - Wirkfluktuation). Es kommt vermehrt zu Dyskinesen (kurzfristige Überbeweglichkeit der Patienten) und teils auch zu Dystonien. Um diese Spätfolgen zu verringern, sollte L-Dopa gerade zu Beginn in so geringen Dosen wie möglich appliziert werden. Auch wurde in den letzten Jahren ein vermehrter Hinweis auf eine eventuell neurotoxische Wirkung des L-Dopa gegeben, die bei Bestätigung zu Problemen in der Therapie des MP mit L-Dopa führen kann (Gerlach et al., 2003; Trenkwalder et al., 2011).

Eine weitere medikamentöse Therapiemöglichkeit, ähnlich des L-Dopa, ist die Gabe von Dopamin-Agonisten, die ebenfalls an den Dopamin-Bindungsstellen im Gehirn binden und eine ähnliche Wirksamkeit haben. Sie werden vermehrt bei jüngeren oder internistisch behandelten Patienten verabreicht.

Weiterhin spielt bei der medikamentösen Therapie die Verwendung von MAO (Monoaminoxidase)-B-Hemmern, wie Selegilin oder Rasagilin, eine Rolle. Diese Medikamente hemmen direkt den Abbau des Dopamins. MAO-B-Hemmer verbessern in Kombination mit L-Dopa fast alle Symptome bei vergleichsweise geringen Nebenwirkungen und werden auch vermehrt bei jüngeren MP-Patienten in Kombination mit L-Dopa verwendet.

Auch COMT (Catechol-O-Methyltransferase)-Hemmer haben therapeutisches Potential. Sie hemmen das Enzym, welches Dopamin abbaut und steigern wie MAO-B-Hemmer die Dopaminkonzentration im Gehirn. Ein Präparat, welches im Gehirn wirkt, ist u.a. Tolcapon. Auch die COMT-Hemmer müssen in Kombination mit L-Dopa verabreicht werden.

Eines der ältesten Medikamente der Parkinson-Therapie sind die Anticholinergika. Sie werden heute nur noch zur Behandlung eines ausgeprägten Tremors verwendet, da sie bei systemischer Applikation zahlreiche Nebenwirkungen, wie z.B. Mundtrockenheit, Gedächtnisstörungen oder Verwirrtheit verursachen.

Neben den medikamentösen Therapiemaßnahmen gibt es auch diverse operative, somit nicht medikamentöse Therapieoptionen. Die bekannteste ist die tiefe Hirnstimulation. Dabei werden operativ 2 dünne Kabel mit Elektroden, durch die später Strom fließt, über ein kleines

Bohrloch durch die Schädeldecke implantiert (je eine Elektrode pro Hirnseite). Die Operation erfolgt am wachen Patienten, da das Gehirn ein schmerzunempfindliches Organ ist. Der Ort der Stimulation ist meist der Nucleus subthalamicus (STN). Wie bei allen Operationen kann es auch hier zu schwerwiegenden Komplikationen kommen, die in 0,5-3% letal enden. Es ist bewiesen, dass ausgewählte Patienten, denen die tiefe Hirnstimulation erfolgreich unterzogen wurde, eine stärkere Verbesserung der Symptome zeigten, als jene, die nur medikamentös behandelt wurden (Weaver et al., 2009).

Neuere Forschungen beschäftigen sich mit dem Ersatz katecholaminerger Zellen im Gehirn, welche die Funktion der untergegangenen dopaminergen Neurone ersetzen sollen. Allerdings soll dies bisher zu keiner Verbesserung geführt haben und die transplantierten Zellen begannen sich bei MP-Erkrankten ebenfalls pathologisch zu verändern (Nachweis des α -Synuclein in den transplantierten Zellen) (Olanow and Prusiner, 2009).

Anzumerken ist hier, dass alle bisher verwendeten Therapiemöglichkeiten des MP lediglich die Symptome lindern, aber nicht die zentrale neuronale Degeneration dopaminergen Neurone bekämpfen. Zudem sind auch noch nicht alle Ursachen, die MP auslösen können, bekannt, insbesondere auf neuronaler Rezeptorebene (Obeso et al., 2010; Gerlach et al., 2003; Oertel et al., 2011; Trenkwalder et al., 2011).

1.2 Extrapyramidalmotorisches System, Basalganglien und ihre Rolle beim Parkinson

Das Extrapyramidalmotorische System (EPMS) umfasst alle zum Rückenmark ziehenden motorischen, nicht pyramidalen Bahnen. Es hat seinen Ursprung sowohl im motorischen Kortex als auch in vielen anderen Kerngebieten des Gehirns, u.a. im Nucleus ruber und der Formatio reticularis. Das EPMS dient der Verschaltung der Basalganglien mit dem motorischen Kortex und dem Thalamus und damit der Vorbereitung von Bewegungen. Eine scharfe Trennung des EPMS zum Pyramidensystem ist aufgrund gleicher kortikaler Ursprungsneurone und gemeinsamer Aktivierung nicht sinnvoll.

Die Basalganglien beschreiben eine Ansammlung von Nervenzellkörpern innerhalb des ZNS, die mit dem Kortex in Verbindung stehen. Sie haben 2 wesentliche Grundfunktionen. Zum einen die Kontrolle des motorischen Kortex und zum anderen die Beeinflussung der spinalen Motorik. Die Basalganglien umfassen den Nucleus caudatus, das Putamen, den GP sowie die SN, den STN und den Nucleus accumbens (AcB).

Einleitung

Die **Substantia nigra** ist der schwarze Kern im Mesencephalon und im Schnittpräparat eines menschlichen Gehirns bereits makroskopisch gut sichtbar. Die schwarze Farbe hat ihren Ursprung im Perikaryon der dopaminergen Neurone, welches viel Neuromelanin enthält. Die SN gliedert sich in eine Pars compacta (pc), welche viele melaninhaltige, dopaminerge Zellen enthält und eine Pars reticularis (pr), die melaninfreie Neurone enthält. Sie dient besonders der Bewegungsinitiation und-planung (Starterfunktion). Der SN überlappend ist das VTA (ventrales tegmentales Areal). Dies ist ebenfalls eine Zellgruppe im Mesencephalon (Teil des meso-limbischen-System = Belohnungszentrum), welche Efferenzen u.a. zum AcB hat. Transmitter dieser Bahn ist Dopamin. Läsionierungen des meso-limbischen Systems führen zu Fehlverhalten im Lern- und Belohnungssystem sowie zu Suchtverhalten.

Das **Putamen** des Menschen hat in Frontalschnitten die Form einer dicken ovalen Scheibe und liegt lateral dem GP. Nucleus caudatus und Putamen zusammen ergeben das Striatum und sind beim Menschen durch die Capsula interna getrennt, aber über Nervenzellbrücken streifenförmig miteinander verbunden. Bei anderen Säugetieren, wie der Ratte, ist das Striatum ein komplett zusammenhängender Kernkomplex, der Caudatus-Putamen-Komplex (CPu). Bei den Ratten ähnelt dieser in Horizontalschnitten des Gehirns einen Tropfen, der sich nach kaudal verjüngt.

Der **Nucleus caudatus** des Menschen wird aufgrund seiner bogenförmigen Ausdehnung in Frontalschnitten zweimal angeschnitten und Schweifkern genannt. Er hat eine wichtige Funktion in der Steuerung der willkürlichen Motorik, wie auch das Putamen.

Der **Globus pallidus** (auch blasse Kugel genannt) ist ein schon makroskopisch hellerer Kern als das Putamen. Die hellere Färbung entsteht aufgrund des Reichtums an bemarkten Fasern. Beim Mensch ist er in GP medialis und lateralis eingeteilt.

Der **Nucleus subthalamicus** (STN) liegt unterhalb des Thalamus. Von unten und medial an den Kern grenzt die SN und der Nucleus ruber. Der STN hat eine bikonvexe Form und enthält spontanaktive glutamerge Neurone. Er hat eine hemmende Funktion auf Bewegungsimpulse.

Der **Nucleus accumbens** (AcB) gliedert sich in Schale und Kern und liegt unterhalb des Caput nuclei caudati. Er hat einen engen Bezug zum limbischen System, zum präfrontalen Kortex und zum VTA. Er beinhaltet zahlreiche Dopamin D₂-Rezeptoren. Somit spielt auch er eine große Rolle beim Suchtverhalten.

Einleitung

Über das limbische System hat der AcB eine direkte Verbindung zum **Gyrus cinguli** (Pars anterior), der ebenfalls eine zentrale Bedeutung bei der Schmerzverarbeitung, der Aufmerksamkeit sowie der emotionalen Motorik spielt.

Ebenfalls in Verbindung zum AcB (und somit den Basalganglien) stehen die **Habenularkerne** (insbesondere die lateralen Habenularkerne [LHB]), die mit dem Belohnungs- und Motivationssystem verbunden sind. Die LHB hemmen die Dopaminfreisetzung. Bei einer Belohnung steigt der Dopaminspiegel. Mit den Habenularkernen verknüpft ist der **Fasciculus retroflexus** (fr) (Meynert-Bündel), der ein Teil der efferenten Riechbahn ist.

Zuletzt muss auch der **Hippocampus** als wichtige Station des limbischen Systems erwähnt werden. Dieser gliedert sich in Gyrus dentatus (DG), Cornu ammonis (CA1-3) sowie dem Subiculum. Afferenzen erhält er u.a. aus der Area entorhinalis, dem Thalamus, dem Septum, sowie dem Gyrus cinguli und Efferenzen gelangen vom Hippocampus z.B. zum Septum, zur Amygdala, zum Hypothalamus, zum AcB oder zur SN. Der Hippocampus dient der Gedächtnisbildung.

Die Basalganglienschleife teilt sich in einen direkten und einen indirekten Weg (Abb. 2). Der direkte Weg (Hauptschleife) beginnt mit dem Kortex, der Efferenzen zum Striatum sendet und dieses dann über den Transmitter Glutamat stimuliert. Das Striatum hemmt über GABA den GP medialis, der somit eine verminderte hemmende Wirkung auf die motorischen Thalamus-Kerne hat. Diese wiederum aktivieren den Kortex vermehrt. Aus diesem Grund entsteht im direkten Weg eine Steigerung der motorischen Aktivität über striatal hemmende Efferenzen. Beim indirekten Weg (Nebenschleife) hemmen die striatalen Efferenzen den GP lateralis, der daraus resultierend den STN vermindert hemmt. Dieser erhält ebenfalls erregende Afferenzen aus dem Kortex und kann den GP medialis nun vermehrt aktivieren. Somit hemmt letzterer die Thalamus-Kerne und verhindert die motorische Aktivierung des Kortex. Dieser Weg hemmt die Motorik (Abbildung 2).

Der Informationsfluss zum Kortex kann über die Neurone der SNpc beeinflusst werden. Dopamin ist der Transmitter dieser nigrostriatalen Neurone. Der Dopamineffekt auf die striatalen Projektionsneurone hängt von den beteiligten G-Protein gekoppelten Rezeptoren ab. Dopamin-1-Rezeptoren (D₁) erhöhen die cAMP-Bildung und wirken erregend, D₂-Rezeptoren hingegen hemmend. Somit sind D₁-Rezeptoren vorwiegend im direkten und D₂-Rezeptoren im indirekten Weg exprimiert. Die D₂-Rezeptoren hemmen (mittels Enkephalin) die striatalen Projektionsneurone der Nebenschleife, der GP lateralis wird daraus resultierend weniger

Einleitung

gehemmt. Der GP lateralis hemmt den STN nun vermehrt und der STN kann wiederum den GP medialis weniger aktivieren. Der GP medialis hemmt schlussendlich den Kortex weniger und dieser ist damit motorisch vermehrt aktiviert. Der Zugang zum indirekten Weg und die Hemmung thalamokortikaler Elemente wird über diesen Weg erschwert. Zum anderen können die dopaminergen D₁-Rezeptoren (über Substanz P) der SNpc die striatalen Efferenzen in der Hauptschleife vermehrt aktivieren und verstärken die Hemmung auf den GP medialis, der daraus resultierend die Thalamus-Kerne noch weniger hemmen kann. Darüber wird die motorische Aktivität im Kortex weiter gesteigert. Somit fördern die Neurone der SNpc die Disinhibition im direkten Weg. Aufgrund dieser Tatsache dient der Transmitter Dopamin in der SNpc bei gesunden Menschen immer der Förderung der Motorik.

Die Rolle der Basalganglien beim MP erklärt sich aus dem Untergang der dopaminergen Neuronen der SNpc. Die SN blasst aus, was bereits makroskopisch beobachtet werden kann. Durch den Untergang der dopaminergen Neurone kommt es im direkten Weg zu einer verminderten Hemmung des GP medialis über die D₁-Rezeptoren und damit zu einer verminderten Aktivierung des Kortex. Ebenso kommt es im indirekten Weg aufgrund des Dopaminverlust zur verringerten Hemmung des GP lateralis und somit auch zum Aktivitätsverlust im Kortex. Zusammengefasst bewirkt der Untergang dopaminergener Neurone in der SNpc, dass der GP medialis die Hemmung auf die Thalamus-Kerne in beiden Wegen verstärkt und damit der motorische Kortex in seiner Funktion gehemmt wird und die Betroffenen an Hypokinese (Reduktion spontaner Bewegungen) und an weitere typische Symptome des MP leiden (Aumüller et al., 2017; Obeso et al., 2008b; Speckmann et al., 2013).

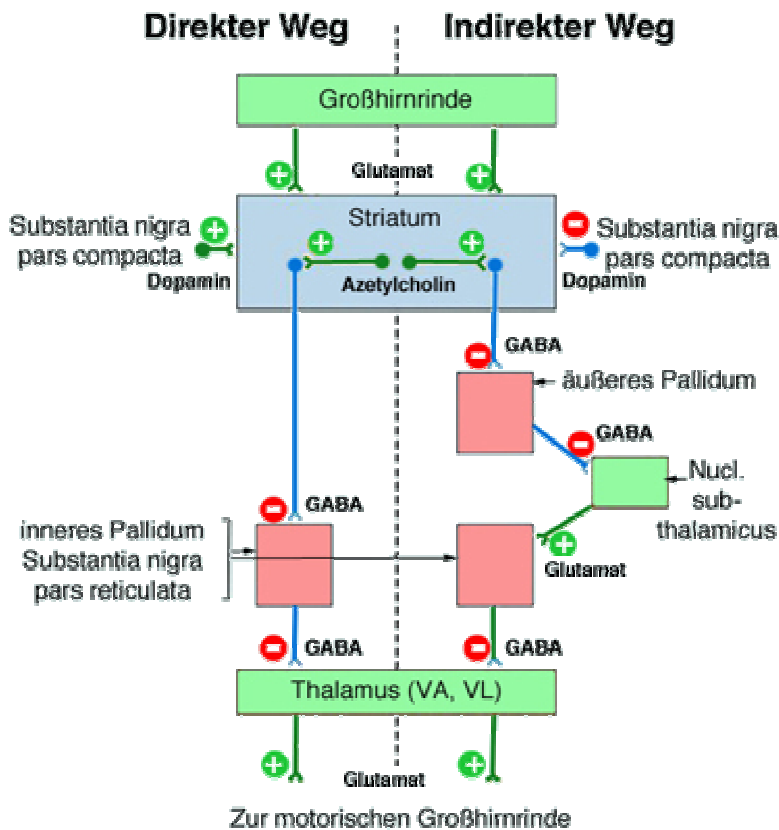


Abbildung 2: Darstellung des direkten und indirekten Weges der Basalganglienschleife

Das innere Pallidum entspricht dem GP medialis und das äußere Pallidum dem GP lateralis. Der Kortex aktiviert in allen Fällen das Striatum. Im direkten Weg (links) hemmt das Striatum den GP medialis, der wiederum keine hemmende Wirkung auf den Thalamus mehr hat. Somit wird die Motorik gesteigert. Im indirekten Weg (rechts) hemmt das Striatum den GP lateralis, der somit nicht mehr den STN hemmen kann. Damit verstärkt der Kern die hemmende Wirkung des GP medialis auf den Thalamus. Hier wird die Motorik gehemmt. Weiteres ist im Kapitel 1.2 beschrieben (Hinghofer-Szalkay and Blumenfeld, 2002).

Ferner sei noch auf besondere Interneuronen im Striatum hingewiesen. Neben den überwiegenden (ca. 97%) Projektionsneuronen, welche GABA als Transmitter verwenden und somit immer hemmend auf ihre Zielprojektionen wirken, gibt es noch 1-2% cholinerge Interneuronen, die erregend über den Transmitter Acetylcholin (Ach) wirken. Dieser ist im Vergleich zu anderen Hirnarealen im Striatum in einer hohen Konzentration vorhanden (Lim et al., 2014). Die cholinergen Interneurone sind spontan aktiv und senden ein fortlaufendes Ach-Signal aus. Das Striatum verfügt über eine hohe Konzentration an Acetylcholinesterase, die das Ach-Signal beendet. Unter allen muskarinen und nikotinischen striatalen

Mechanismen verbessert die fortlaufende nikotinische Ach-Aktivität (nAch) am meisten die potentielle Dopaminfreisetzung (Zhou et al., 2002b).

1.3 BoNT-A und seine bisherige Anwendung zur Therapie von Erkrankungen

Das Botulinum-Neurotoxin (BoNT) wird von einer speziellen Gruppe anaerober, gram-positiver, stäbchenförmiger Bakterien, den Clostridium botulinum, produziert. Es sind derzeit 8 Untergruppen des BoNT bekannt: A, B, C1, C2, D, E, F, G, die jeweils von den einzelnen Stämmen des Clostridium botulinum synthetisiert werden. Dabei erkennen BoNT-B, -D, -F und -G spezifisch VAMP/Synaptobrevin, ein Protein der synaptischen Vesikel im SNARE-Komplex, das sich bei Bindung des Peptids spaltet. Die Art der Spaltung unterscheidet sich in den einzelnen Neurotoxinen. BoNT-A und -E erkennen und spalten Snap25 im SNARE-Komplex, ein Protein der präsynaptischen Membran. BoNT-C spaltet Syntaxin. VAMP, Snap25 und Syntaxin spielen eine zentrale Rolle bei der Neuroexozytose. Diese wird durch alle BoNT-Untergruppen verhindert (Abbildung 3).

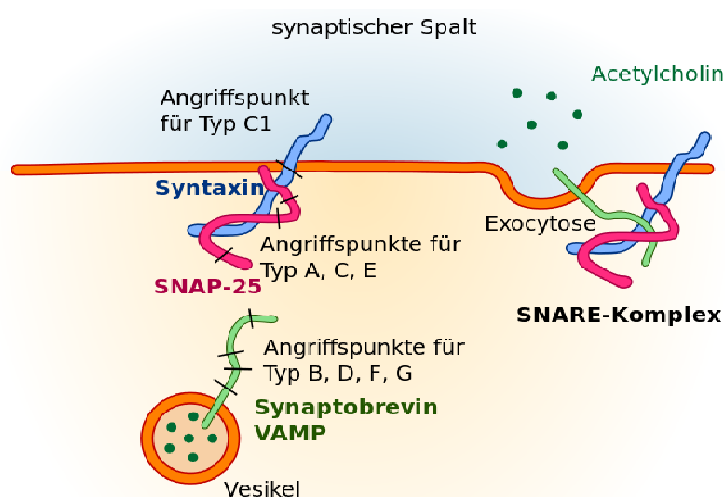


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Angriffspunkte der verschiedenen Botulinum-Neurotoxin-Untergruppen am SNARE-Komplex

Auf der rechten Seite der Abbildung wird die Exozytose des Ach in den synaptischen Spalt dargestellt. Die durch den Ca^{2+} -Einstrom induzierte Bildung des SNARE-Komplexes ermöglicht dabei die Verbindung der Ach-Vesikel mit der präsynaptischen Membran und somit die Freisetzung des Transmitters in den Spalt. Die linke Seite der Abbildung zeigt die BoNT-Arten und ihre Wirkung auf den SNARE-Komplex. BoNT-C greift an Syntaxin an, BoNT-A und -E an Snap 25 und BoNT-B, -D, -F und -G spalten VAMP. Somit wird von allen die Transmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt durch Verhinderung der Verschmelzung der Vesikel mit der präsynaptischen Membran über den SNARE-Komplex gehemmt (Matthias, 2017).

BoNT-A blockiert die periphere Ach-Freisetzung an den präsynaptischen Endigungen der Nervenfasern und unterbricht somit die Impulsübertragung vom Nerven auf den Muskel. Daraus resultieren Lähmungen der quergestreiften und glatten Muskulatur. Die Hemmung erfolgt über Zink-Endopeptidasen des BoNT. Diese verfügen über spezielle Sequenzen und können an Zink-Koordinaten binden sowie auf Mechanismen der Aktivierung und Zielerkennung an der präsynaptischen Membran wirken. Im terminalen Axon cholinergischer Nerven spalten sie die Fusionskomplexe (SNARE-Komplex), die die Bindung und Verschmelzung Ach-enthaltender Vesikel mit den präsynaptischen Membranen regulieren. Sie verhindern somit die Entstehung eines Aktionspotentials an der motorischen Endplatte, was zur Erschlaffung der Muskulatur führt (Berg, 2013; Dickerson and Janda, 2006; Mehlan et al., 2016; Montecucco and Schiavo, 1995).

BoNT besteht aus einer leichten und einer schweren Kette, die über eine Disulfidbrücke und ionische Kräfte miteinander verbunden sind. Es sind die schweren Ketten, die für die Giftwirkung der jeweiligen Untergruppe verantwortlich sind. Nach Resorption docken diese an spezifische Rezeptoren auf der Plasmamembran cholinergischer Nervenendigungen an. Man nimmt an, dass für jedes Serotyp-spezifische Neurotoxin unterschiedliche Rezeptoren existieren (für BoNT-A z.B. ist dieser Rezeptor ein synaptisches Vesikelprotein, den sogenannten Protein Typ 2 [SV2]), mit denen sie an die präsynaptische Membran binden können (Dong et al., 2006). Wurde das Neurotoxin durch Endozytose (über den N-terminalen Teil der schweren Kette vermittelt) in die synaptische Endigung aufgenommen, so ändert es im sauren Milieu seine Konformation (pH-abhängig) und die leichte Kette wird in das Zytosol des Neurons über eine von der schweren Kette gebildeten Pore eingeschleust. Die beiden Ketten trennen sich durch zelleigene Reduktionsenzyme. Die leichte Kette wirkt als Protease, da diese die zinkabhängige Metallendopeptidase Region zur Spaltung des SNARE-Komplexes enthält (Berg, 2013; Mehlan et al., 2016; Naumann, 2003) (Abbildung 4).

BoNT-A, welches in dieser Arbeit eine Rolle spielt, spaltet Snap-25 des SNARE-Komplexes. Das Neurotoxin dringt über SV2 (Vesikelprotein/Rezeptor) in die synaptische Endigung ein. Der SV2-Rezeptor hat drei Isotypen: SV2A, SV2B und SV2C, die in der Membran der synaptischen Vesikel verankert sind. SV2A und B kommen in allen Hirnregionen vor, wobei das höchste Level an SV2B im Kortex und Hippocampus und das höchste Level an SV2A in den subkortikalen Regionen ist. SV2C ähnelt stärker dem SV2A und kommt vermehrt im

phylogenetisch alten Hirnregionen wie dem GP, der SN, dem Mittelhirn, dem Hirnstamm sowie dem Bulbus olfactorius vor (Bajjalieh et al., 1993; Janz and Südhof, 1999).

Die Fähigkeit des BoNT auch andere Transmitter-Systeme neben den cholinergen System zu hemmen, hängt bewiesener Maßen maßgeblich von der Konzentration ab (Bigalke et al., 1985). Die Dosis macht das Gift. Die drei vorhandenen BoNT-A-Präparate, die zur Zeit beim Menschen verwendet werden, sind in ihrer Wirksamkeit und im Nebenwirkungsprofil nicht vergleichbar. Die Präparate dürfen für therapeutische Zwecke somit niemals äquivalent dosiert werden, da es sonst zu schweren Nebenwirkungen kommen kann (Naumann, 2003).

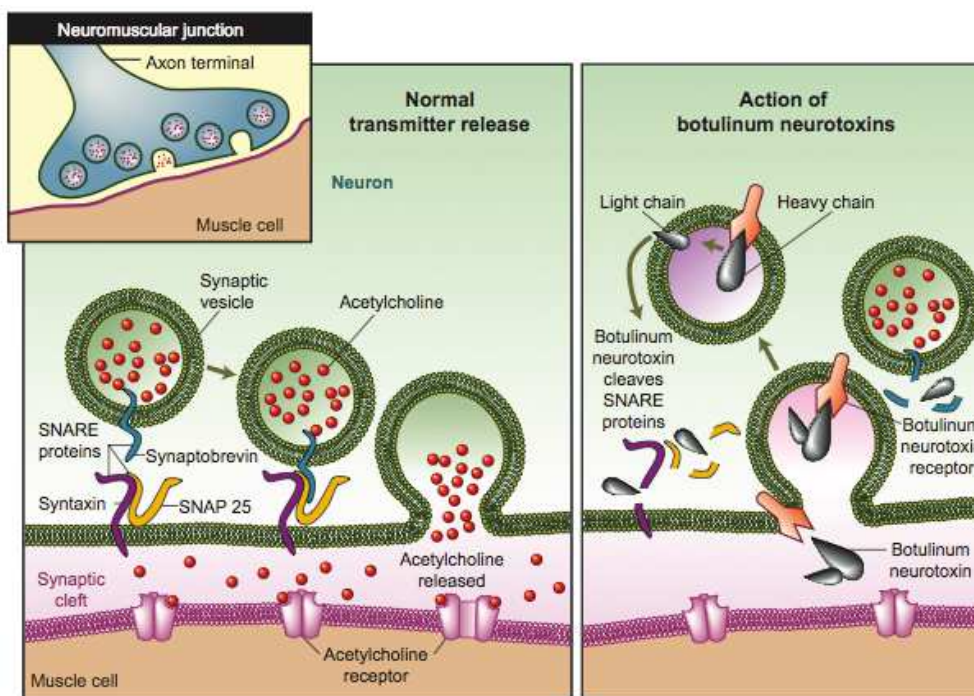


Abbildung 4: Schematischer Ablauf der normalen Transmitterexozytose (links) sowie der Wirkung von BoNT an der motorischen Endplatte (rechts)

BoNT (rechts) spaltet den SNARE-Komplex, sodass sich die synaptischen Vesikel mit Ach nicht mehr mit der präsynaptischen Membran verbinden können und der Transmitter nicht mehr in den synaptischen Spalt abgegeben werden kann. Somit erfolgt keine Entstehung eines Aktionspotentials an der motorischen Endplatte. Der Muskel erschlafft. Um seine Wirkung auszuführen muss BoNT mit seiner schweren Kette zunächst an ein synaptisches Vesikelprotein (für BoNT-A ist dies SV2) binden. Aufgrund der folgenden pH-Änderung im Vesikel ändert die schwere Kette ihre Konformation, lagert sich in die Vesikelmembran ein und schafft einen Kanal, durch den die leichte Kette in das Zytoplasma der synaptischen Endigung diffundieren kann. Dort spaltet die leichte Kette das SNARE-Protein, was letztlich die Transmitterausschüttung verhindert. Die linke Abbildung zeigt noch einmal die normale Exozytose des Ach an der motorischen Endplatte über den SNARE-Komplex (Dickerson and Janda, 2006).

Vergiftungen mit BoNT werden als Botulismus bezeichnet. Erste Symptome treten in Form von Kopf- und Magenschmerzen nach 12-14 Stunden auf und können bei Nichtbehandlungen nach 3-6 Tagen durch Lähmung der Atemmuskulatur zum Tode führen (Müller et al., 2009).

Bisherige Therapieversuche mit BoNT-A ergaben eine Verbesserung des Tremors und Rigors bei MP (Mittal et al., 2017; Naumann, 2003), eine Verbesserungen der fehlerhaften Spannungszustände in Fuß und Sprunggelenk (Gupta and Visvanathan, 2016) sowie eine Verbesserung der chronischen Hypersekretion der Speicheldrüsen (Laing et al., 2008). BoNT-A wurde insbesondere zur Behandlung von Dystonien im Halsbereich (Bledsoe and Comella, 2016), zur Behandlung von oromandibulären Dystonien (Comella, 2018) oder für ästhetische Behandlungen im Gesichtsbereich (hier Botox abgekürzt) (Hsu and Frankel, 2017) verwendet. Die behandelten Muskeln (oder auch Drüsen) werden dabei über direkte Injektion des BoNT am Muskel oder indirekte Injektion (Umgebung des Muskel) ganz oder teilweise in ihrer Funktion ausgeschaltet (Gupta and Visvanathan, 2016). Ergebnisse von Wree et. al können im Sinne eine selektive Hemmung der Freisetzung von Ach durch lokal appliziertes BoNT-A interpretiert werden. Die intrastriatale Anwendung speziell von BoNT-A kann hier lokalisierte, relativ funktionelle, enthemmte hypercholinerge Aktivität bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie MP, antagonisieren, wobei Nebenwirkungen der systemischen anticholinergen Behandlung vermieden werden. Es kann somit die motorischen Symptome eines experimentellen Hemiparkinsons der Ratte für einen Zeitraum von 3-6 Monaten unterdrücken und vielleicht in Zukunft die Motorik MP Erkrankter verbessern (Wree et al., 2011).

1.4 Acetylcholinerge Rezeptoren, ihre Bedeutung und die verwendeten Liganden

1.4.1 Nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor

Der nikotinische Acetylcholin-Rezeptor (nAch-Rezeptor) gehört zu den am besten erforschten ionotropen Rezeptoren mit Neurotransmitter-Ionen-Kanälen. Sie dienen der Übertragung von Nervenimpulsen von den motorischer Nervenendigungen zu den Muskelfasern (neuromuskulär) und der synaptischen Übertragung in autonomen Ganglien (neuroneuronal).

Der nAch-Rezeptor ist prä- und postsynaptisch in der Zellmembran lokalisiert. Innerhalb des Striatums wurde er prädominant in dopaminergen Neuronen und auf kortikostriatalen und nigrostriatalen Terminalen (präsynaptisch) sowie in den acetylcholinergen Interneuronen (postsynaptisch) des Striatum beschrieben (Happe et al., 1994; Jones et al., 2001; Kaiser and

Wonnacott, 2000; Pradhan et al., 2002; Schwartz et al., 1984) (Abbildung 5). Dort modulieren sie insbesondere die Glutamat-bzw. Dopamin-Freisetzung (Zhou et al., 2003).

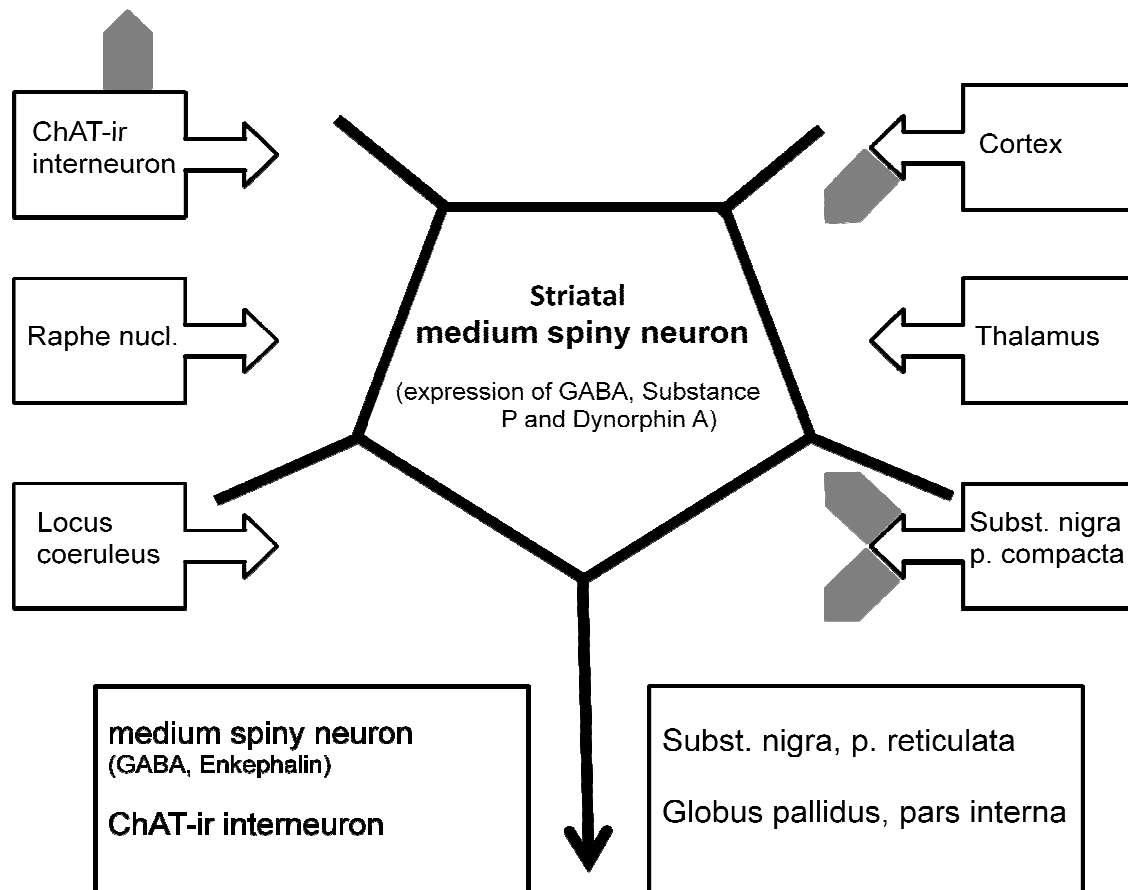


Abbildung 5: Lokalisation des nAch-Rezeptors im Striatum

Die grauen Pfeile markieren die Lokalisation des Rezeptors. Innerhalb des Striatums ist der nAch-Rezeptor prädominant in dopaminergen Neuronen und auf kortikostriatalen und nigrostriatalen Terminalen (präsynaptisch) sowie in den acetylcholinergen Interneurone (postsynaptisch) beschrieben (eigene Darstellung anhand im Text benannter Quellen).

Nikotinrezeptoren sind Oligomere und bestehen aus einem Ring von 5 Untereinheiten, die einen zentralen Tunnel für ein Ion bilden (Pore). Sie werden in α -, β -, γ -, δ -Untereinheit unterteilt. Der muskuläre nAch-Rezeptor ist ein Glykoprotein, welches aus 5 Untereinheiten besteht, die um eine Membranspannungspore angeordnet sind. Die Untereinheiten bestehen wiederum aus Aminosäuresequenzen und enthalten eine große extrazelluläre Amino-(N)-terminale Domäne. Alle Untereinheiten zeigen eine hohe Ähnlichkeit zu den jeweils anderen Untereinheiten. In embryonalen und denervierten Muskeln weist der muskuläre Typ des Rezeptors die Zusammensetzung $2(\alpha 1)$, β , γ und δ -Untereinheiten auf, dabei wird im adulten

Typ des Rezeptors die γ -Untereinheit gegen ε ausgetauscht. Der adulte Typ des muskulären nACh-Rezeptor befindet sich vorwiegend in der Endplatten-Region der Muskelfasern, während der embryonale Typ über die gesamte Muskelfaser verteilt ist (Colquhoun et al., 2003; Hamouda et al., 2009; Jensen et al., 2005).

Im Gegensatz zu den muskulären nACh-Rezeptor hat der neuronale Typ wesentlich mehr Gene, die mehr Untereinheiten (Subtypen) kodieren, davon 9 α - und 3 β -Untereinheiten. Die Untereinheiten 7 und 9 können als einzige allein funktionsfähige homomere Rezeptoren bilden. Die α -Untereinheiten 2, 3, 4 und 6 haben diese Fähigkeit nicht. Sie benötigen eine passende β -Untereinheit. Das sind heteromere Kombinationen, die funktionelle Rezeptoren bilden können. Die Stöchiometrie dieser Rezeptor-Kombination liegt bei 2 α zu 3 β (Boorman et al., 2000; Cooper et al., 1991) und in Analogie zum muskulären Typ des Rezeptors bei einer Topologie von $\alpha\beta\alpha\beta\beta$. Die $\alpha 10$ -Untereinheit kann eine funktionelle Form nur in Kombination mit $\alpha 9$ ausbilden. Die Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 3$ können nur einen Rezeptor in Verbindung mit einem Paar einer klassischen α und β -Untereinheit bilden (z.B. $\alpha 2$ - $\alpha 4$ + $\beta 2$ oder $\beta 4$) (Ramirez-Latorre et al., 1996; Sgard et al., 2002).

Die in-situ-Hybridisierung zeigt, dass der Subtyp $\alpha 4\beta 2$ die im ZNS am weitesten verbreitete Kombination zweier unterschiedlicher Untereinheiten ist. Die Subtypen $\alpha 3$ und $\beta 4$ sind dagegen die häufigsten Untereinheiten in autonomen Ganglien und chromaffinen Zellen. Diese Verteilung ist aber nicht absolut (Sargent, 2000).

Der hier verwendete Ligand [^3H]-Epibatidin (Alkaloid/ Hautsekret des Pfeilgiftfrosches) hat eine starke schmerzstillende Wirkung und denselben Effekt wie Nikotin am nACh-Rezeptor (Agonist). Da das reine Epibatidin zu toxisch war, wurde die umgewandelte Form ABT-594 verwendet, welche dieselbe analgetische, aber eine geringere toxische Wirkung hat. Epibatidin bindet mit einer hohen Affinität an heteromere neuronale nACh-Rezeptoren und mit wesentlich geringerer Affinität an homomere neuronale und muskuläre nACh-Rezeptoren. [^3H]-Epibatidin bindet bevorzugter an $\beta 2$ - als an $\beta 4$ -beinhaltenden Rezeptoren, was anhand von Tiermodellen bewiesen werden konnte (Parker et al., 1998; Xiao and Kellar, 2004). Der Agonist [^3H]-Epibatidin wurde hier verwendet, da er zu den meisten nACh-Rezeptor-Untereinheiten eine hohe Bindungsaffinität im zentralen und peripheren Nervensystem zeigt. Studien haben zudem gezeigt, dass dieser Agonist im Ratten-Gehirn genauso Nikotin-Rezeptoren bindet wie im menschlichen Gehirn (Houghtling et al., 1995; Marks et al., 1998).

1.4.2 Muskarin-Rezeptor 1

Der M₁-Rezeptor, auch Muskarin-Rezeptor 1 genannt, wird ebenfalls durch den Neurotransmitter Ach aktiviert. Alle M-Rezeptoren kommen sowohl in der Körperperipherie als auch im ZNS vor. Der M₁-Rezeptor liegt vermehrt in vegetativen Ganglien, im ZNS (Hippocampus, Striatum und Cortex) und in exokrinen Drüsenzellen vor und ist an Lern- und Erinnerungsprozessen (Hippocampus und Cortex) beteiligt (Levey, 1993). Der Subtyp ist postsynaptisch im CPu vorrangig auf den mittelgroßen bedornten Neuronen (MSN = medium spiny neuron; 78%), insbesondere auf deren Perikarya und Dendriten lokalisiert (Bauer et al., 2005; Haghiri et al., 2009; Hersch et al., 1994; Levey et al., 1991; Yan et al., 2001). Er inhibiert bevorzugt die GABA-Freisetzung (mit der Folge einer erhöhten Erregbarkeit der Neurone) sowie in geringerem Ausmaß die Glutamat-Freisetzung an glutamergen Präsynapsen durch die Aktivierung anderer präsynaptischer M-Rezeptoren (Sugita et al., 1991). Die In-situ-Hybridisierungshistochemie zeigte eine Prävalenz von M₁-mRNA in unterschiedlichen kortikalen und subkortikalen Regionen, wie der pyramidalen Zellschicht des Hippocampus, der Körnerzellschicht des DG, des Bulbus olfactorius, der Amygdala, des Tuberculum olfactorium und des piriformen Kortex. Das CPu und der zerebrale Cortex zeigten dabei mäßige Markierungsgrade (Buckley et al., 1988; Weiner et al., 1990) (Abbildung 6).

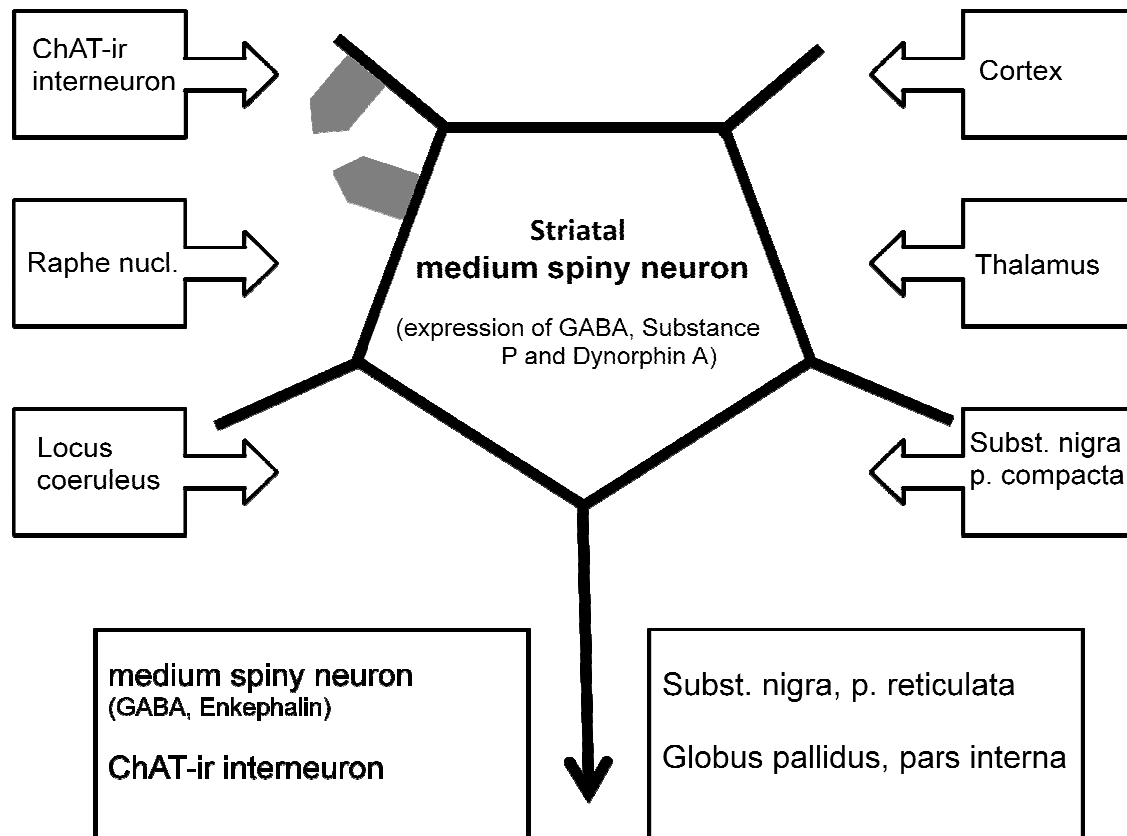


Abbildung 6: Lokalisation des M₁-Rezeptors im Striatum

Die grauen Pfeile markieren die Lokalisation des Rezeptors. Der Subtyp M₁ ist präsynaptisch im CPu vorrangig auf den mittelgroßen bedornten Neuronen (78%) (auf Perikarya und Dendriten) lokalisiert (eigene Darstellung anhand im Text benannter Quellen).

Anders als der nACh-Rezeptor bildet der M-Rezeptor keine Ionenkanäle, durch welche Anionen oder Kationen diffundieren können. Er ist ein metabotroper Rezeptor. Die Bindung des Ach findet nicht an demselben Membranprotein statt, welches auch die Ionenkanalöffnung bewirkt, sondern zunächst an einem assoziierten G-Protein. Über das hier aktivierte G_q-Protein wird die Phospholipase C_β aktiviert. Diese aktiviert wiederum Inositoltrisphosphat und Diacylglycerin als second messenger, die einen Kalzium-Einstrom (Ca²⁺) bewirken und somit ein spätes exzitatorisches postsynaptisches Potential erzeugen.

Agonisten erregen die M-Rezeptoren direkt und ahmen in der Pheripherie die Parasympathikuswirkung nach, weshalb sie auch als Parasympathikomimetika bezeichnet werden. Beispiele für Agonisten sind Acetylcholin oder Muskarin (Gift des Fliegenpilzes). M-Rezeptor Antagonisten wirken nicht direkt auf den Rezeptor, sondern nur dort, wo M-Rezeptor Agonisten vorhanden sind, die diese dann verdrängen können. Andernfalls sind die

Antagonisten unwirksam. Je Untergruppe des M-Rezeptors gibt es verschiedene selektive Antagonisten. Sie hemmen die Wirkung des Parasympathikus in der Peripherie und werden somit als Parasympathikolytika bezeichnet. Sie werden auch direkt zur Behandlung von MP eingesetzt.

Der Ligand [^3H]-Pirenzipin ist ein spezifischer Antagonist des M_1 -Rezeptors, der zu M_1 eine 100-fach höhere Affinität als zu $M_{2/3}$ -Rezeptoren aufweist (Aktories et al., 2013; Fryer et al., 2012).

1.4.3 Muskarin-Rezeptor 2

Der M_2 -Rezeptor kommt typischerweise im Herzen vor, wo er eine negativ chrono-, dromo- und ionotrope Wirkung hat, aber auch im ZNS/Hirnstamm ist er zu finden (Levey, 1993). Dort ist er im basalen Vorderhirn, Striatum, meso-pontinalem Tegmentum und motorischen Kernen reichlich vorhanden. Die M_2 -Rezeptoren sind ebenfalls vorrangig auf MSN (2,5%) und Ach-Interneuronen im Striatum lokalisiert (Bauer et al., 2005; Haghiri et al., 2009; Hersch et al., 1994; Mash and Potter, 1986; Zhou et al., 2003) (Abbildung 7). M_2 -mRNA, welche in den großen, ovalen und selten vorhandenen Neuronen vorkommt, war im medialen Septum, dem Riechkolben und den pontinen Kernen nachweisbar (Buckley et al., 1988; Weiner et al., 1990). Dabei ist die Verteilung von M_2 -Rezeptor ähnlich der von cholinergen Neuronen und legt nahe, dass der M_2 -Rezeptor ein Autorezeptor ist. Allerdings ist dieser Rezeptor auch in nicht-cholinergen kortikalen und subkortikalen Strukturen vorhanden, was beweist, dass er die Freisetzung anderer Neurotransmitter präsynaptisch modulieren kann und/oder postsynaptisch funktioniert (Levey et al., 1991). Im Kortex regulieren die Rezeptorsubtypen M_2 und M_3 beide die glutamerge Freisetzung von kortikalen Nervenenden (Calabresi et al., 1998; Pakhotin and Bracci, 2007). Präsynaptische M_2 - (und auch M_4 -) Rezeptoren regulieren die Glutamat-Freisetzung aus kortikostriatalen Afferenzen und die GABA-Freisetzung aus GABAergen Interneuronen (Benarroch, 2012).

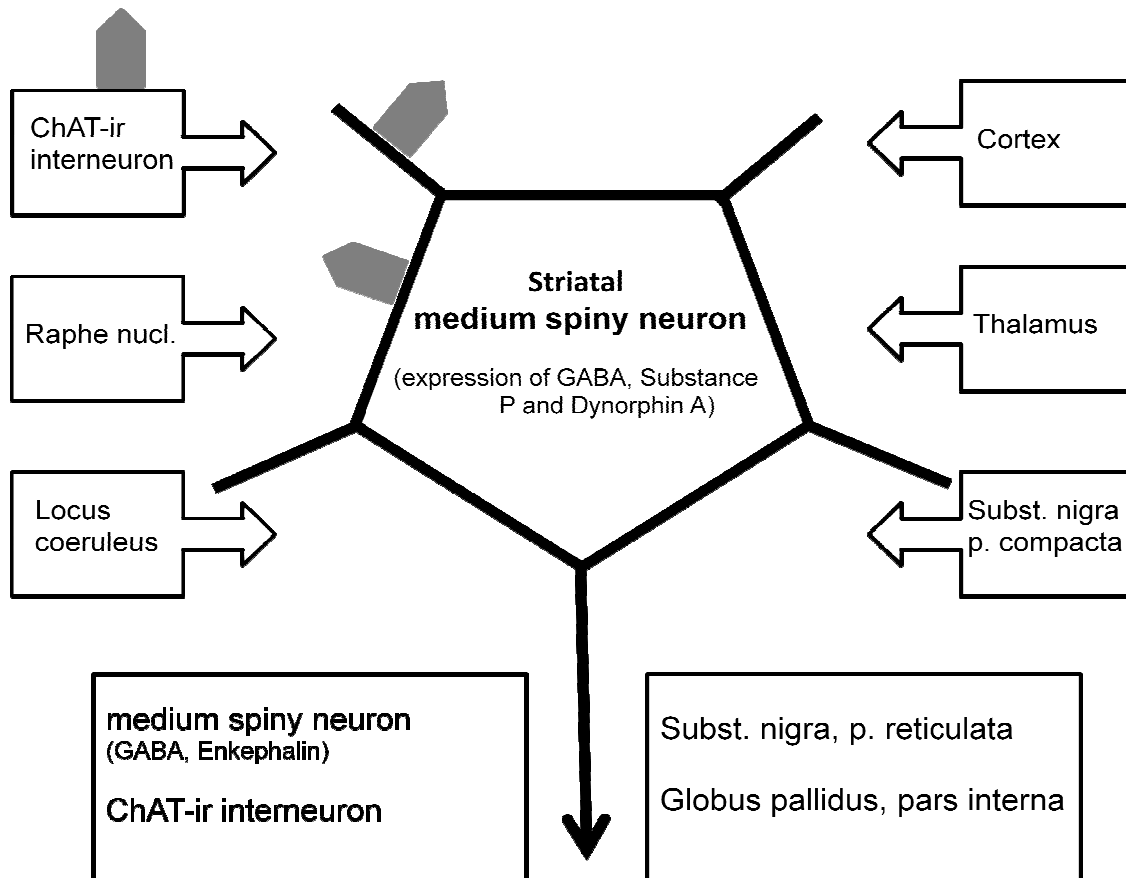


Abbildung 7: Lokalisation des M₂-Rezeptors im Striatum

Die grauen Pfeile markieren die Lokalisation des Rezeptors. Die M₂-Rezeptoren sind vorrangig postsynaptisch auf MSN (2,5%) und Ach-Interneuronen im Striatum lokalisiert (eigene Darstellung anhand der Quellen aus dem Text).

Der M₂-Rezeptor selber wirkt über das G_i-Protein, welches eine Ausschüttung von Ca²⁺ über die Hemmung der Adenylatzyklase verhindert. Die selektiven M₂-Antagonisten erhöhen den cholinergen Überfluss durch Reduzierung der Autorezeptorfunktion im ZNS und in der Peripherie. Im ZNS, besonders im CPu, wirken die M₂-Rezeptoren als inhibitorische Heterorezeptoren auf dopaminerge Kanäle.

Oxotremorin, ein parasymphathikomimetisch wirksames Alkaloid, ist ein Agonist des M₂-Rezeptors. Oxotremorin induziert einen biphasischen Effekt auf die spontane Feuerung in den Neuronen des Gehirns. Es handelt sich dabei um eine frühe kurze Erhöhung der Feuerungsrate, gefolgt von einer Hemmung der Spontanaktivität. Dieser Prozess kann durch nicht-selektive M-Rezeptor-Antagonisten (wie Atropin) oder selektive Antagonisten wie Pirenzepin geblockt werden. Oxotremorin-M hat zudem eine depressive Wirkung auf die neuronalen Entladungen, die durch Glutamat oder Ach ausgelöst werden. Eine

Langzeitverbesserung der durch Glutamat und Ach ausgelöste Antworten wurde dabei auch festgestellt (Lin and Phillis, 1991). Oxotremorin hat keine Effekte auf nikotinische Bereiche sowie Acetylcholinesterasen oder Cholinacetyltransferasen. Seine agonistische Wirkung wird auch nicht durch Acetylcholinesterasen verstärkt. Sowohl zentrale, als auch periphere Effekte des Oxotremorins können durch Antagonisten gehemmt werden und durch andere Muskarinagonisten, welche tertiäre Amine besitzen, nachgeahmt werden (z.B. Arecoline, Aceclidine). Experimente haben auch gezeigt, dass [^3H]-Oxotremorin die spezifische Bindung von [^3H]-Antagonisten des M-Rezeptors in verschiedenen Geweben hemmen kann (Ringdahl and Jenden, 1983).

Dagegen ist [^3H]-AF-DX 384 ein selektiver Antagonist der M-Rezeptoren 2 und 4 und wird u. a. für die Darstellung der Rezeptorverteilung im Gehirn zur Erforschung von MP verwendet. Die Affinität des [^3H]-AF-DX 384 zu humanen M_2 -Rezeptoren ist doppelt so hoch wie zu M_4 -Rezeptoren, 15mal so hoch wie zu M_3 -Rezeptoren und 55mal so hoch wie zu M_1 -Rezeptoren (Miller et al., 1991).

1.4.4 Muskarin-Rezeptor 3

Der M_3 -Rezeptor kommt typischerweise an glatten Muskelzellen und Drüsenzellen vor, wo er Kontraktion und Sekretion vermittelt. Aber auch im ZNS ist dieser Rezeptor vertreten, allerdings in höherer Konzentration als die übrigen M-Rezeptoren (Levey, 1993). Forschungen ergaben, dass das M_3 -Protein im ZNS in limbischen kortikalen Regionen, wie Hippocampus und anterioren Thalamus-Kernen, Riechkolben, Striatum sowie in geringen Mengen im DG, in superioren Colliculus- und pontinen-Kernen lokalisiert ist (Buckley et al., 1988; Levey et al., 1994). Die M_3 -Rezeptoren sind ebenfalls auf MSN lokalisiert, sowie auf Terminale der kortikalen und thalamischen Afferenzen (Haghir et al., 2009; Levey et al., 1994; Yan et al., 2001; Zubieta and Frey, 1993) (Abbildung 8).

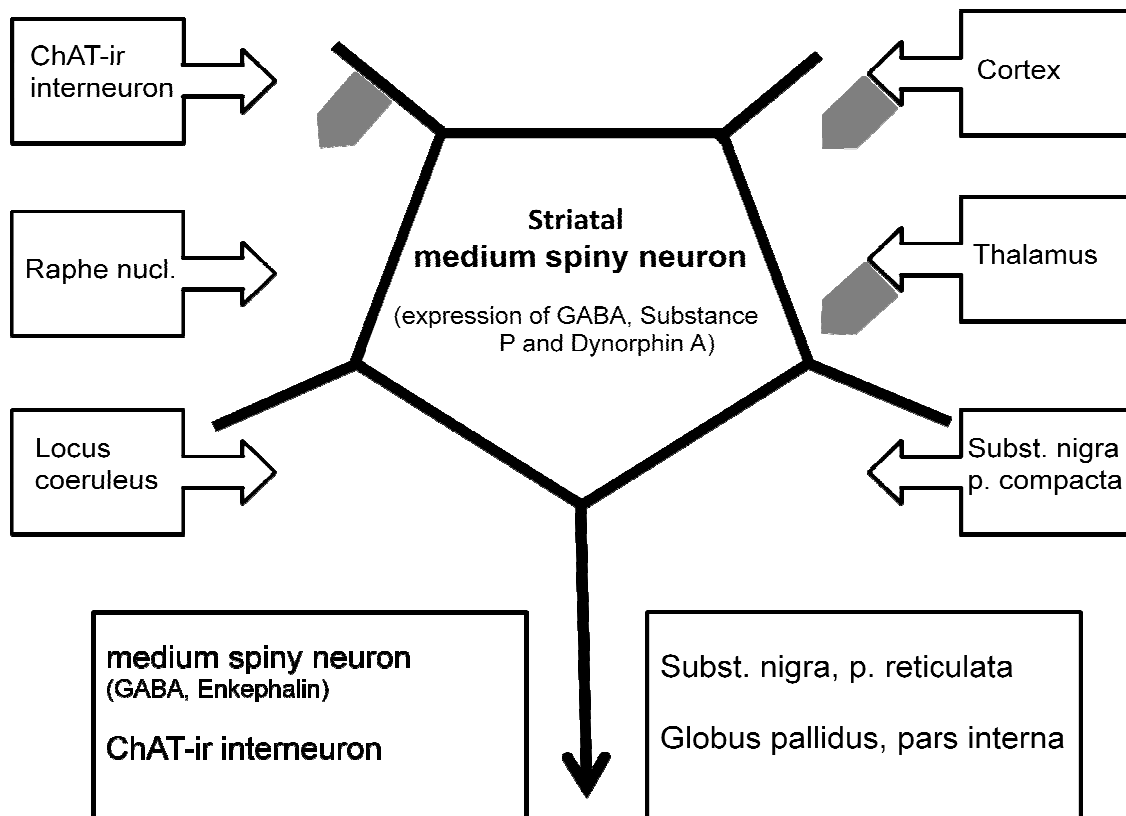


Abbildung 8: Lokalisation des M₃-Rezeptors im Striatum

Die grauen Pfeile markieren die Lokalisation des Rezeptors. Die M₃-Rezeptoren sind auf MSN lokalisiert, sowie auf Terminale der kortikalen und thalamischen Afferenzen (eigene Darstellung anhand der Quellen aus dem Text).

Ähnlich wie der M₁-Rezeptor ist M₃ über G_q gekoppelt und stimuliert so die intrazelluläre IP₃ Signaltransduktion, die zum Einstrom von Ca²⁺ und somit zur Kontraktion der glatten Muskelzellen führt. Auch wird die NO-Synthase (im Endothel) aktiviert, die eine Relaxation der Muskelzellen bewirkt. M₃-Rezeptoren spielen im Gehirn eine zentrale Rolle bei der Nahrungsaufnahme (Shi et al., 2010).

Ein Beispiel für einen selektiven M₃-Rezeptorantagonist ist das 4-Damp. 4-Damp ist ein 4-Diphenyl-Acetoxy-N-methyl-Piperidin-Methiodid, welches auch ein Antagonist des M_{1/2}-Rezeptors ist, bevorzugt aber an M₃ bindet. Es bindet vollständig an der Ach-Bindungsseite des mACh-Rezeptors. 4-Damp hat die Fähigkeit, die Frequenz der spontanen erregenden postsynaptischen Ströme in zahlreichen Zellen zu blocken (Zhang et al., 2007). Dabei wird suggeriert, dass M₃ die Glutamat-Freisetzung in Interneuronen moduliert. Der Oxotremorin-

Effekt auf diese Zellen wird komplett durch 4-DAMP gehemmt (Aktories et al., 2013; Fryer et al., 2012).

Abschließend ist den acetylcholinergen Rezeptoren noch beizufügen, dass die genauen Funktionen der nACh und der mACh-Rezeptor-Subtypen weiterhin Gegenstand laufender Forschung sind, auch im Bezug des therapeutischen Potentials ihrer zahlreichen Agonisten und Antagonisten.

1.5 Glutamerge Rezeptoren, ihre Bedeutung und die verwendeten Liganden

1.5.1 NMDA-Rezeptor

Der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA) gehört zu der Kategorie der ionotropen Rezeptoren, die durch den Agonisten N-Methyl-D-Aspartat, nach dem sie benannt wurden, aktiviert werden. Sie kommen vor allem im ZNS vor, besonders auf dendritischen Schäften exzitatorischer Synapsen (Postsynapse) des Hippocampus und Kortex. Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der synaptischen Plastizität, die der Bildung von Gedächtnisinhalten über Langzeitpotentierung (LTP) im Gehirn dient. Auch werden sie für exzitotoxische Prozesse verwendet. Der NMDA-Rezeptor wird in 3 Untergruppen eingeteilt: GluN 1-3.

NMDA-Liganden-Bindungsstellen sind in den Strukturen der Basalganglien reichlich vorhanden und NMDA-Rezeptoren konnten in diesen Regionen mit neuronaler Erregbarkeit, Neuropeptid-Genexpression und Regulation der Dopaminfreisetzung verbunden werden. Standaert et al. haben mit der in-situ-Hybridisierung die Expression dieser Gene in den Ratten-Basalganglien untersucht. NMDA₁-Rezeptor-Untereinheiten werden überall in den Basalganglien sowie im Rest des Gehirns exprimiert. NMDA₂-Rezeptor-Untereinheiten weisen eine differentielle Expression auf. So ist die NMDA_{2B}-Rezeptor-Untereinheit im Striatum reichlich vorhanden, die NMDA_{2A}-Rezeptor-Untereinheiten jedoch nur in geringen Mengen. NMDA_{2C}-Rezeptor-Untereinheiten sind nur in der SNpc vorhanden, während NMDA_{2D}-Rezeptor-Untereinheiten vermehrt in der SNpc, dem STN, dem GP und dem ventralen Pallidum vorkommen (Standaert et al., 1994). Ergebnisse von Tarazi et al. zeigen weiterhin, dass die meisten NMDA-Rezeptoren im Ratten-CPu und AcB auf intrinsischen postsynaptischen Neuronen vorkommen. Einige NMDA-Rezeptoren wurden auch auf kortikostriatalen Projektionen in Verbindung mit Dopamin₄-Rezeptoren gefunden. Diese können jeweils exzitatorische präsynaptische NMDA-Autorezeptoren und inhibitorische D₄-Heterorezeptoren darstellen, die die Gutamat-Freisetzung aus kortikostriatalen Axonen in medialem CPu und AcB regulieren (Tarazi et al., 1998) (Abbildung 9).

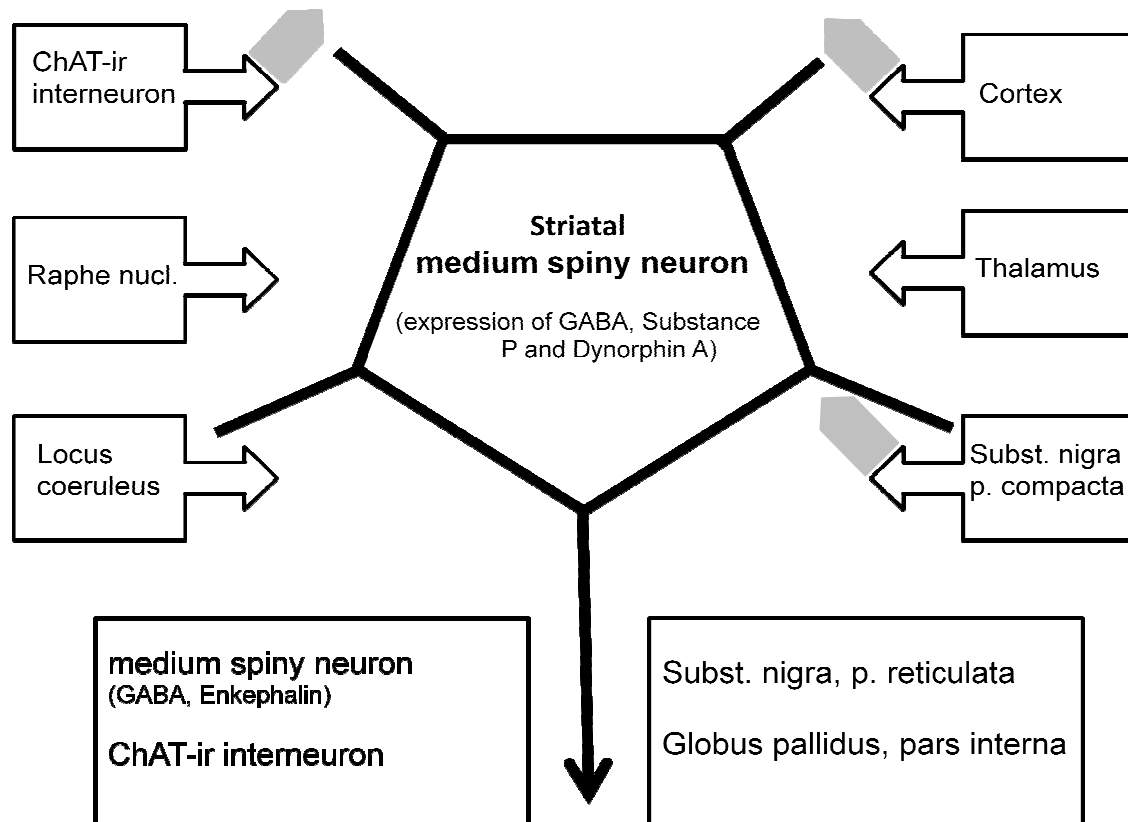


Abbildung 9: Lokalisation des NMDA-Rezeptors im Striatum

Die grauen Pfeile markieren die Lokalisation des Rezeptors. Einige der NMDA-Rezeptoren wurden auch auf kortikostriatalen Projektionen sowie in der SNpc gefunden. Weiterhin sind diese Rezeptoren auch auf den Ach-Interneuronen zu finden (eigene Darstellung anhand der Quellen aus dem Text).

Funktionelle NMDA-Rezeptoren sind Heterotetramere, die aus 2 GluN1 Untereinheiten und je 2 GluN2 oder GluN3 Untereinheiten bestehen (Monyer et al., 1992). Eine extrazelluläre Amino-terminale Domäne ist mit einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne verknüpft, die wiederum mit einer Transmembran-Domäne verknüpft ist, die den eigentlichen Ionenkanal formt. Diese Transmembranhelix kommuniziert mit einer intrazellulären Carboxy-terminalen Domäne (für weitere Information siehe: Traynelis et al., 2010). Für die Aktivierung des NMDA-Rezeptors, der sich aus GluN1/GluN2 Untereinheiten zusammensetzt, werden 2 Moleküle des Koagonisten Glycin und 2 Moleküle des Agonisten Glutamat benötigt. Rezeptoren, die aus GluN1/GluN3 Untereinheiten bestehen, benötigen nur Glycin zur Aktivierung. Glycine sind in der cerebrospinalen Flüssigkeit des Gehirns zu finden. Kürzlich wurden auch D-Serine als Koagonisten des Rezeptors an Synapsen beschrieben, während Glycin vorrangig in extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren vorkommt.

Nachdem ein Agonist/Koagonist an dem Rezeptor gebunden hat, öffnet sich der nicht selektive Ionenkanal (besonders für Ca^{2+} -Einstrom). Damit steigt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration (im Neuron) signifikant an. Kalzium ist der Schlüssel für die LTP (Neuroplastizität), aber auch für den exzitotoxischen Zelltod.

Besonders anzumerken ist die Tatsache, dass NMDA-Rezeptoren als sogenannte Koinzidenzdetektoren wirken. Das heißt, dass die Kalziumleitfähigkeit über den Ionenkanal nur dann gegeben ist, wenn eine gleichzeitige prä- und postsynaptische Depolarisation vorliegt. Diese Depolarisation ist nötig, da der Kanal des NMDA-Rezeptors zwischen den beiden Untereinheiten durch ein Magnesiumion blockiert ist, das sich bei der entstehenden Depolarisation löst und die Passage durch den Kanal freigibt. Das Auftreten einer beidseitigen Depolarisation und damit der Einstrom von Ca^{2+} ist allerdings nicht der Regelfall und bedeutet, dass eine Synapse häufig genutzt wird. Sie wird somit plastiziert. Das entspricht unserem Lern- und Gedächtnismechanismus (LTP) (Nörenberg et al., 1999).

NMDA-Rezeptoren spielen eine besondere Bedeutung in der Neurologie u.a. bei der Therapie von MP. Ein Antagonist des NMDA-Rezeptors ist MK-801 (hohe Affinität). Für diesen Antagonisten hat der Rezeptor eine weitere Bindungsstelle, die im Inneren des Ionenkanals liegt. MK-801 ist ein Dizolipin und ein nicht-kompetitiver, spannungsabhängiger Hemmstoff des NMDA-Rezeptors, wie es neurophysiologische Experimente im Ratten-Gehirn ergaben (Wong et al., 1986). Es verursacht eine Blockade des Stromflusses, der durch NMDA ausgelöst wird. Ähnlich wie die M-Rezeptor-Antagonisten wirkt auch MK-801 nur in Verbindung mit NMDA (Agonist). Dabei wird die Blockade durch einen kontinuierlichen Zufluss von NMDA verstärkt. Die Bindung und Entfernung des Antagonisten ist nur dann möglich, wenn sich der NMDA-Kanal im Transmitter-aktivierten Stadium befindet. Das Magnesiumion, welches die Aktivierung des NMDA-Ionenkanals hemmt, hemmt auch die Blockade des MK-801 bei einem negativen Membranpotential (Huettner and Bean, 1988). Somit verhindert MK-801 bei Applikation des NMDA (oder andere Agonisten) die Kanalaktivität maßgeblich (McBain and Mayer, 1994; Vyklícky et al., 2014).

1.5.2 mGlu 2/3-Rezeptor

Der mGlu 2/3-Rezeptor ist ein metabotroper Glutamat-Rezeptor (mGlu-Rezeptor), der ebenfalls durch Liganden wie L-Glutamat oder N-Acetylaspartylglutamat aktiviert wird. Er ist G-Protein gekoppelt und kommt in Gliazellen und an prä- und postsynaptischen Membranen glutamerger Neuronen vor. Der mGlu 2/3 Rezeptor ist im präfrontalen Kortex und auch in

dopaminergen Zellgruppen exprimiert (Ghose et al., 2008). Um die Funktion dieser Rezeptoren aufzuklären, haben Testa et al. in-situ-Hybridisierungen verwendet, um die Expressionsmuster von mGluR1 und mGluR5 in den Basalganglien erwachsener Ratten zu untersuchen. Im Striatum waren alle diese mGlu-Rezeptoren in stark variierenden relativen Dichten vorhanden. MGlu 2-Rezeptoren wurden in einer kleinen Population von großen polygonalen striatalen Neuronen exprimiert. Der STN war die einzige andere Basalganglienstruktur, die diesen Subtyp exprimiert. Deutliche zelluläre Verteilungen der mGlu-Rezeptor-Expression wurden auch innerhalb des AcB, des GP, des ventralen Pallidums und der SN beobachtet. Der mGlu 3-Rezeptor wird auch in der Glia aller Basalganglienstrukturen exprimiert. Er wurde auch in Neuronen im Striatum, SN, und sehr schwach im STN beobachtet. Ein Vergleich der eingeschränkten mGlu 2/3-mRNA-Verteilungen mit der Verteilung von metabotropen Liganden-Bindungsstellen unterstützt den Verdacht einer möglichen präsynaptischen Lokalisierung für diese Rezeptoren in den Basalganglien (Testa et al., 1994) (Abbildung 10).

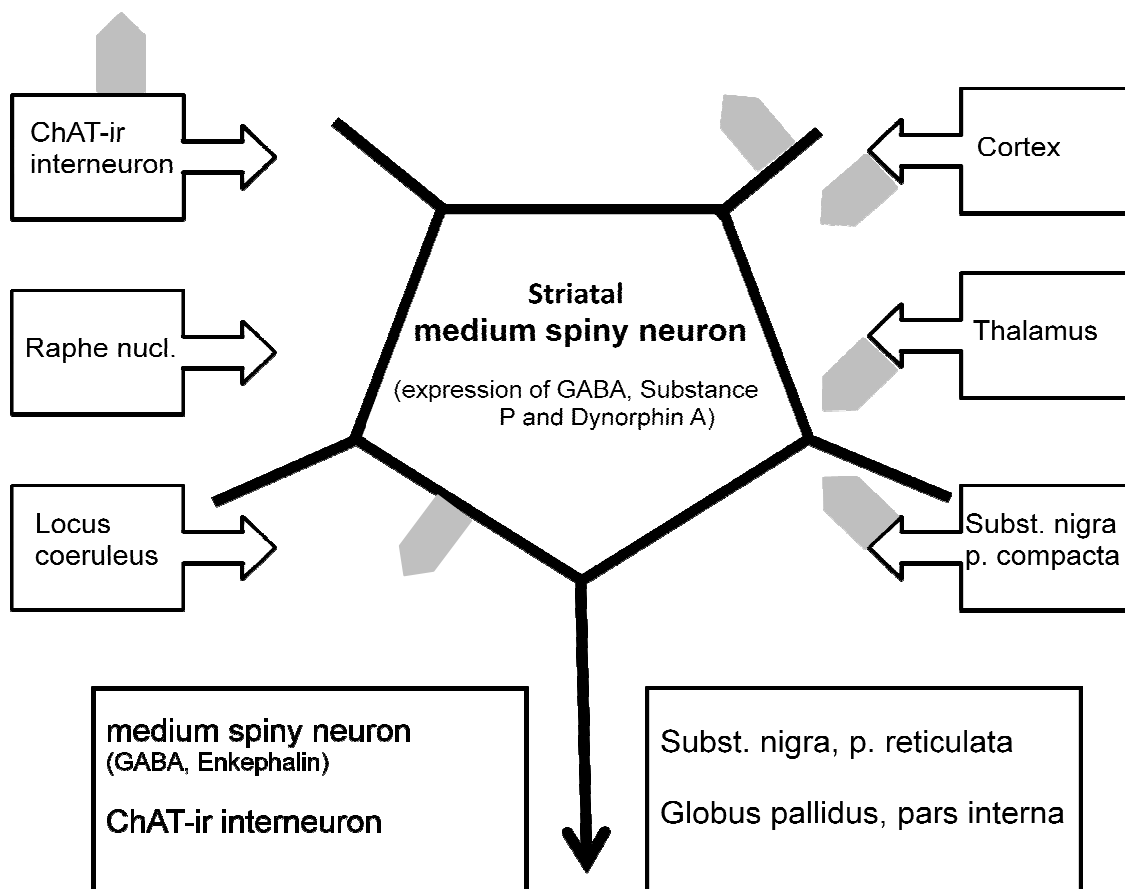


Abbildung 10: Lokalisation des mGlu 2/3-Rezeptors im Striatum

Einleitung

Die grauen Pfeile markieren die Lokalisation des Rezeptors. Besonders stark exprimiert ist dieser in striatalen Neuronen, SNpc und auch in kortikalen Arealen (eigene Darstellung anhand der Quellen aus dem Text).

Die Erregung präsynaptischer mGlu-Rezeptoren verhindert die exzitatorische als auch inhibitorische Beeinflussung der Ca^{2+} -Kanäle. Dagegen modulieren die postsynaptischen Rezeptoren die Aktivität vieler liganden- und spannungsgesteuerten Ionenkanäle. Die Aktivierung des mGlu-Rezeptors kann die Effekte des NMDA-Rezeptors in den Pyramidenzellen des Hippocampus verstärken sowie die Erhöhung der Kalziumkonzentration durch die NMDA-Rezeptoren in den Körnerzellen des Cerebellums hemmen (Gerlach et al., 2016). Er wird in mehrere Untergruppen eingeteilt. Dabei wirken die Rezeptor-Subtypen mGlu 2/3 über das G_i -Protein. Sie hemmen die Adenylatcyclase und darüber die Ca^{2+} -Freisetzung. Die mGlu 2/3-Rezeptoren gehören zu den Rezeptoren der langsamen synaptischen Übertragung mit einer Latenzzeit von 10 ms, ausgehend von der Bindung des Transmitters bis zum Einsetzen des Effekts. Bei diesen Rezeptoren sind, anders als bei den ionotropen Rezeptoren, die Bindungsstellen für den Transmitter und zelluläre Effektoren getrennte Einheiten. Die Verbindung zwischen Rezeptor und zytoplasmatischen Effektoren stellen die G-Proteine her (Nörenberg et al., 1999).

Hier verwendeten wir einen niedrig-nanomolaren potenten, selektiven Rezeptor-Antagonisten des mGlu 2/3 Rezeptors: [^3H]-LY 341/495. Dieser Radioligand wurde zur Markierung von mGlu 2-Rezeptoren in Rattenhirnen entwickelt (Ornstein et al., 1998). Bei höherer Konzentration des Antagonisten vermag dieser auch andere Untergruppen des mGlu-Rezeptors zu hemmen. LY 341/495 wurde in diversen Arbeiten verwendet und zeigt antidepressive Effekte in Tiermodellen. Auch haben Studien bewiesen, dass dieser Antagonist an menschlichen Membranen, die mGlu 2/3-Rezeptoren ausbilden, mit einer reversiblen, sättigbaren und hohen Affinität bindet, was für die Forschung mit Tiermodelle im Vergleich zum Menschen von Bedeutung ist (Johnson et al., 1999; Wright et al., 2001).

1.5.3 Kainat-Rezeptor

Der Kainat-Rezeptor ist wie der NMDA-Rezeptor ein ionotroper Glutamat-Rezeptor und besitzt einen tetrameren Ligandenkanal sowie eine große transmembranäre Pore, die selektiv für Kationen (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und Cs^+), aber nicht für Anionen ist. Die Funktion dieses Rezeptors ist bisher wenig erforscht und es gibt nur Hinweise, dass der Kainat-Rezeptor in den Synapsen des Hippocampus und Rückenmark lokalisiert ist. In autoradiografischen Rezeptor-Bindungsstudien hat man herausgefunden, dass die ionotropen exzitatorischen

Glutamat-Rezeptoren vorrangig postsynaptisch lokalisiert sind und die Dichte in den menschlichen Hirnarealen variiert. So findet man den Kainat-Rezeptor vorrangig in der CA3 Region des Hippocampus, im Kortex und im lateralen Septum (Gerlach et al., 2016). Unter Kainat-Rezeptoren wurden KA₂ in etwa 50-60% mittelgroßer Neuronen des Striatum nachgewiesen, während KA₁ auf 20-30% dieser Neuronen beschränkt waren (Bernard et al., 1996) (Abbildung 11).

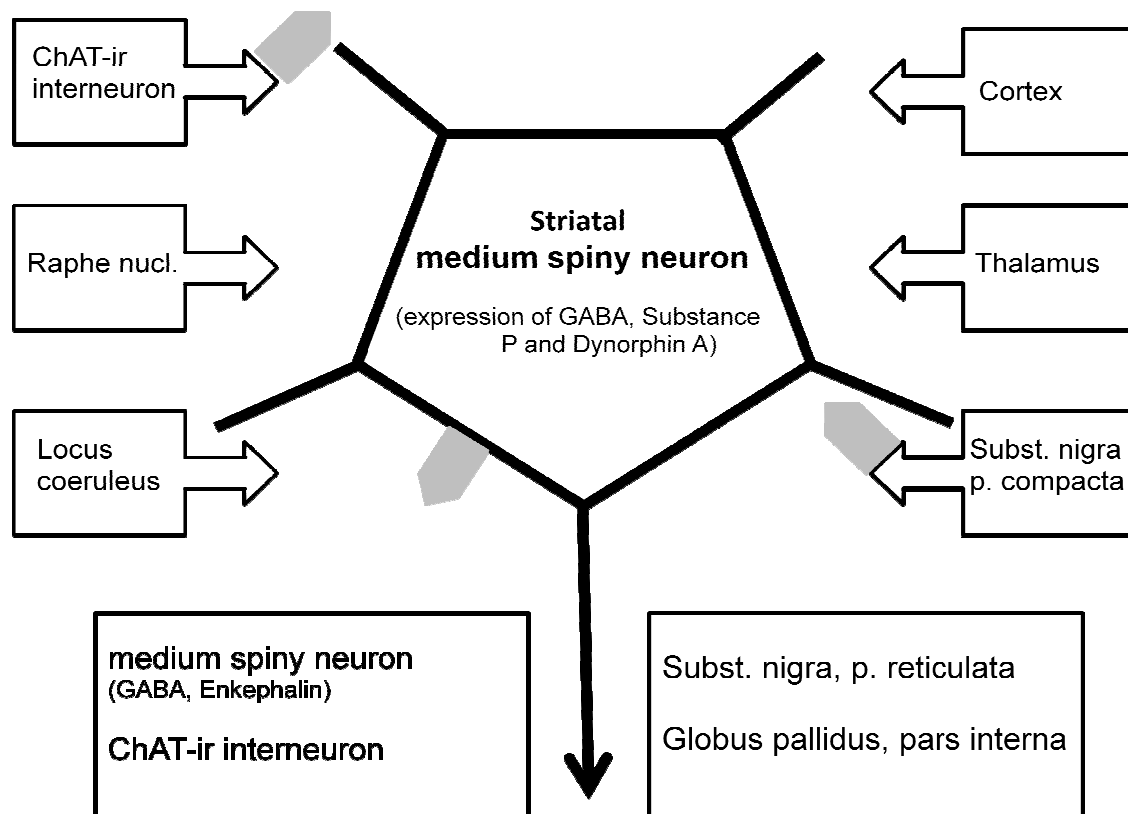


Abbildung 11: Lokalisation des Kainat-Rezeptors im Striatum

Die grauen Pfeile markieren die Lokalisation des Rezeptors. 50-60% des Kainat-Rezeptors wurden auf mittelgroßer bedornten Neuronen nachgewiesen. Weitere sind in der SNpc und den Ach-Interneuronen zu finden (eigene Darstellung anhand der Quellen aus dem Text).

Als Teil der Glutamat-Rezeptorfamilie spielt auch er eine Rolle bei Lern- und Gedächtnisvorgängen über die Erschaffung exzitatorischer synaptischer Transmission im ZNS (Traynelis et al., 2010). Das heißt, dass auch hier eine übermäßige Stimulation durch neurotoxische Effekte zum Untergang der Neuronen führt, welche mit diesen Rezeptoren ausgestattet sind (Exzitotoxizität). Aufbau und Funktion ähneln dem NMDA-Rezeptor.

Ein Agonist des Kainat-Rezeptors, nach dem dieser auch benannt wurde, ist Kainat (Kainsäure). Kainat ist ein pflanzliches Strukturanalogon zur Glutaminsäure und wirkt wie dieses exzitatorisch und exzitotoxisch. Er wird wie auch andere selektive Agonisten und Antagonisten zur Erforschung der physiologischen Rolle des Rezeptors und des möglichen therapeutischen Potentials für diverse Erkrankungen wie MP genutzt (Bleakman et al., 2002).

1.6 Tiermodell

Tiermodelle werden benötigt, um neuropathologische Veränderungen, pathologische Mechanismen- und mögliche Therapieansätze für MP zu erforschen. Das meist verbreitete Modell für MP ist das Toxin-induzierte Rattenmodell, welches Aspekte der Erkrankung des MP über die Zerstörung nigrostriataler Bahnen im Ratten-Kortex wiedergibt. In diesem Hemiparkinson-Modell der Ratte spielt die Verwendung des Katecholamin-Neurotoxin 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) eine herausragende Bedeutung. Alternativ ist auch MPTP (Neurotoxin) für die Simulation von Parkinsonsyndromen in Tiermodellen bekannt. Systemisch verabreicht kann das 6-OHDA die Bluthirnschranke nicht überwinden, daher wird dieses direkt injiziert, z.B. in die SNpc (Lokalisation dopaminergere Zellkörper), ins Striatum oder dem medialen Vorderhirnbündel (MVB; aufsteigende Bahn des dopaminergen, nigrostriatalen Traktes) (Ungerstedt, 1968). Histologisch wird dabei ein Verlust katecholaminer (Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin) Neurone im nigrostriatalen Trakt sichtbar, wobei Neurone mit Ach, GABA oder 5-HT als Transmitter nicht zerstört werden. Das bedeutet, dass mit diesem Modell eine isolierte Läsion der SN dargestellt wird, die wiederum mögliche Folgen des MP auf andere Areale nicht beschreibt. Bei dem Tiermodell wird das Neurotoxin unilateral appliziert, dabei weist bei einer unilateralen Läsion die nicht läionierte (Kontrollseite) keine Veränderungen vor, da dopaminerge Neuronen der SNpc sehr wenige (bis keine) Verbindungen zur kontralateralen Hirnhälfte ausbilden (Schwartz and Huston, 1996a, 1996b). Je nach Konzentration des 6-OHDA können verschiedene Stadien des MP dargestellt werden (Gubellini and Kachidian, 2015).

Um eine Läsion durch 6-OHDA im ZNS zu erzielen, wird dieses zunächst über Dopamin-Transporter (DAT) in die dopaminergen Zellen (Neurone) aufgenommen. Auch zeigt das 6-OHDA eine hohe Affinität zu Noradrenalin-Transportern. 6-OHDA sowie MPP⁺ (aus MPTP in Gliazellen gebildet) haben die Fähigkeit die Bildung des ROS (Reaktive Sauerstoff Spezies) direkt im Zytoplasma der Zielzelle zu veranlassen und die ATP Produktion zu senken. Dies führt zum apoptotischen Zelltod. Der Untergang dopaminergere Neurone kann neben 6-OHDA auch durch viele weitere Mechanismen hervorgerufen werden. So z.B. über

Maneb Rotenon (giftiges Pflanzenschutzmittel), das den Komplex 3 des mitochondrialen Respirationstrakts hemmt, während weitere mitochondriale Toxine den Komplex 1 hemmen. Auch kann die Apoptose über LPS, welches Mikrogliazellen zur Freisetzung inflammatorischer Mediatoren aktiviert, die wiederum RNS (reaktive Stickstoff-Spezies) bilden, ausgelöst werden. Letzteres, die Hemmung von Proteasomen durch z.B. Lactacystin oder PSI, führt zur Bildung von Zerstörungsproteinen, die die DNA zerstören und somit ebenfalls zum Zelluntergang führen (Abbildung 12) (Zigmond et al., 1989).

Die motorischen Syntome, welche durch eine Läsion mit 6-OHDA ausgelöst werden, sind nur in den Ratten sichtbar, die eine Zerstörung des nigrostriatalen Traktes größer 95% erfahren haben. Dabei entwickeln sich die Verluste von Funktionen kurze Zeit nach Injektion des 6-OHDA (Blandini and Armentero, 2012; Duty and Jenner, 2011; Gerlach et al., 2003; Gubellini and Kachidian, 2015; Mehlan et al., 2016).

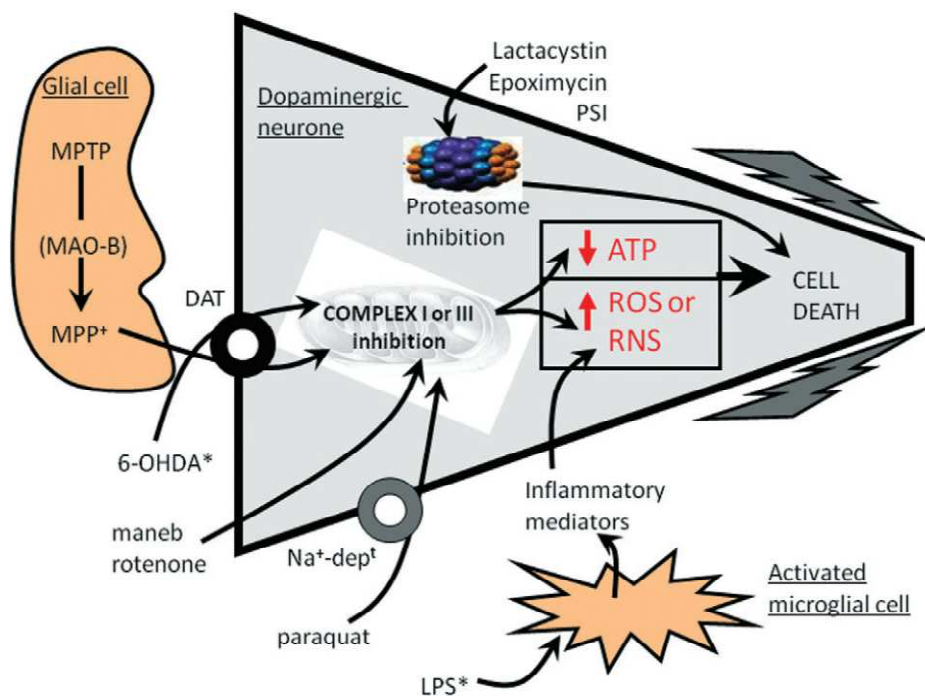


Abbildung 12: Schematische Darstellung eines SNpc Neurons mit den Mechanismen verschiedener Neurotoxine, die eine nigrostriatale Degeneration in Tiermodellen für MP auslösen können

Mit Sternchen markierte Faktoren müssen direkt in das Gehirn injiziert werden, alle anderen erreichen die Zielzelle systemisch. Das im hier verwendeten Tiermodell genutzte 6-OHDA gelangt über DAT-Transporter in das dopaminerge Neuron und führt zur Hemmung mitochondrialer Komplexe. Dem folgen ein Anstieg des ROS und eine Abnahme des ATP, was zur Apoptose der Zelle führt. Daraus erklärt sich der Untergang dopaminerges Neurone nach Injektion des 6-OHDA in spezielle Hirnareale (SN, Striatum, mediales Vorderhirnbündel), die zur Entstehung eines Hemiparkinsons in Ratten verwendet werden. Weitere Faktoren, die wie 6-OHDA den Zelltod auslösen, werden im Kapitel 1.6 beschrieben (Duty and Jenner, 2011).

Zur Testung der erfolgreichen unilateralen Läsionierung der Ratten mit 6-OHDA wird ein Dopamin-Rezeptor-Agonist verabreicht, wie z.B. das Apomorphin. Dieser führt bei den Ratten zu einer zur läsierten Seite hin gerichteten kontralateralen Rotation. Dabei hängt die Anzahl der Drehungen vom Schädigungsgrad der dopaminergen Neurone (hier >90%) im nigrostriatalen Trakt ab (Hefti et al., 1980).

1.7 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, Veränderung von Rezeptordichten (RD) ausgewählter Rezeptoren in ausgewählten Hirnbereichen von Hemiparkinson-Ratten weiter zu erforschen, um weitere sowie vollständigere Daten zu generieren. Ausschlaggebend dafür war, dass die Neurotransmitter und Transmitter-Rezeptoren wesentlicher Bestandteil der neuronalen Informationsverarbeitung sind. Für viele Erkrankungen des ZNS, wie auch MP, ist bekannt, dass die gestörte Neurotransmitter-Homöostase und Abweichungen im Verteilungsmuster der Transmitter-Rezeptoren zu einer Beeinträchtigung der neuronalen Signaltransmission führen. Neben der Ermittlung der Veränderung der RD in diversen Hirnarealen der Hemiparkinson-Ratten, konnte unsere Gruppe in den letzten Jahren mit einem neuartigen experimentellen therapeutischen Ansatz an diesen Ratten ebenfalls zeigen, dass eine intrazerebrale BoNT-A-Injektion (Botulinum-Neurotoxin-A) die 6-OHDA-induzierten motorischen Störungen für mindestens 3 Monate mindert oder ganz aufhebt (Antipova et al., 2013, 2017; Wree et al., 2011). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass BoNT-A entscheidend in die bestehenden Veränderungen durch 6-OHDA auf Rezeptor-Ebene eingreift und eine regulierende Wirkung zu haben scheint.

Die vorliegende Dissertation untersucht die Veränderungen der RD muskarinischer und nikotinischer Acetylcholin-Rezeptoren sowie Glutamat-Rezeptoren in ausgewählten Hirnarealen von 3 Tiergruppen:

- 1- Unbehandelten Kontrollratten
- 2- Hemiparkinson-Ratten + BoNT-A-Injektion
- 3- Hemiparkinson-Ratten + sham-Injektion (Vehikel-Injektion)

Die Auswertung autoradiographisch erfasster Areale im Rattenhirn erfolgt unter Verwendung der graphischen Analysesoftware MCID™ Analysis. Die entsprechenden Injektionsexperimente und die Erstellung der Autoradiogramme unter Nutzung der Radioliganden [³H]-Epibatidin (nACh), [³H]-Pirenzipin (M₁), [³H]-Oxotremorin (M₂, Agonist), [³H]-AF-DX 384 (M₂, Antagonist), [³H]-4-Damp (M₃), [³H]-Kainat (Kainat), [³H]-

Einleitung

LY 341/496 (mGlu 2/3) und [³H]-MK 801 (NMDA) erfolgten dabei im Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock und durch Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Neurowissenschaften und Medizin am Forschungszentrum Jülich.

Ziel dieser Arbeit ist es, zu prüfen, ob

- 1) die unilaterale Injektion von 6-OHDA in das rechte MVB der Ratte die autoradiographisch gemessene ipsilaterale RD der acetylcholinergen- und glutamatergen-Rezeptoren verändert und ob eine anschließende intrazerebrale Applikation eines Puffers (sham-BoNT/Vehikellösung) Auswirkungen auf die RD hat.
- 2) bei den Versuchen Veränderungen in den gemessenen RD in Abhängigkeit von der Überlebenszeit nach Läsion erkennbar sind.
- 3) die aufeinander folgende Injektion von 6-OHDA in das rechte MVB und BoNT-A in das rechte Striatum die RD der nACh-, mACh- (vom Subtyp M₁, M₂ und M₃), Kainat-, NMDA- und mGlu 2/3-Rezeptor moduliert und ob hierbei zeitliche Veränderungen (über einen Zeitraum von 9 Monate) erkennbar sind.

Diskutiert werden abschließend unter Berücksichtigung der bereits publizierten Literatur und auf Grundlage der erhobenen Daten die Effekte von intrazerebral appliziertem 6-OHDA und BoNT-A auf die Verteilung der Rezeptoren und dessen potentielle Wirkmechanismen. Dabei stellt sich insbesondere die Frage, ob der bereits beschriebene motorisch positive Effekt von BoNT-A durch Veränderung der RD in den Hirnarealen der Hemiparkinson-Ratten erklärt werden kann? Und ob Rezeptor-assoziiert ein therapeutischer Ansatz in Hemiparkinson-Ratten, insbesondere mit BoNT-A erkennbar ist, der für eine Therapie des MP von Bedeutung sein kann?

2. Material und Methoden

Die tierexperimentellen stereotaktischen Injektionsversuche und die Entnahme der Hirne wurden von Prof. Dr. med. A. Wree durchgeführt. Die Herstellung der Hirnschnitte wurde von Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Neurowissenschaften und Medizin am Forschungszentrum Jülich und des Institutes für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt.

2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Versuchstiere stammten aus der Charles River WIGA (Sulzfeld, Deutschland). Es handelte sich um 124 drei Monate alte männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von ca. 250 Gramm. Diese Ratten wurden in Standardkäfigen unter den Bedingungen eines künstlichen 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus bei $22 \pm 2^\circ \text{C}$ zu dritt gehalten. Die Möglichkeit der Wasser- und Nahrungsaufnahme *ad libitum* war 24 Stunden den Tag gegeben. Alle Versuchstiere wurden gemäß den gesetzlichen Tierschutzbestimmungen und den Auflagen der zuständigen Behörde behandelt und sämtliche Experimente von der zuständigen Behörde genehmigt (LAFFL 7221.3-1-005/16).

Die Versuchstiere wurde für diese Arbeit in drei Hauptgruppen aufgeteilt: **LB** – Tiere mit 6-OHDA- und BoNT-A-Injektion; **LV** – Tiere mit 6-OHDA- und Vehikel-Injektion (sham-BoNT); **K** – unbehandelte Kontrollen. Einen Überblick gibt hierzu Tabelle 1.

Tabelle 1: Details über die in der Arbeit verwendeten Gruppen mit den entsprechenden Überlebenszeiten

Überlebenszeit/Alter beschreibt die zeitliche Abfolge der Injektionen und den Zeitpunkt der Hirnentnahme; n = Anzahl Tiere. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis

Gruppe	Charakteristiken	Überlebenszeit	n
Kontrollgruppe (K)	unoperierte Ratten	300 g KG + 6 Wochen (K)	7
6-OHDA + BoNT-A (LB)	erhielten 24µg 6-OHDA + 1 ng BoNT-A	6 Wochen nach 6-OHDA + 1 Monat nach BoNT-A (LB6W1M) 6 Wochen nach 6-OHDA + 3 Monate nach BoNT-A (LB6W3M) 6 Wochen nach 6-OHDA + 6 Monate nach BoNT-A (LB6W6M) 6 Wochen nach 6-OHDA + 9 Monate nach BoNT-A (LB6W9M)	9 8 8 8
6-OHDA + Vehikel (LV)	erhielten 24µg 6-OHDA +	6 Wochen nach 6-OHDA + 1 Monat nach Vehikel (LV6W1M)	6

	Vehikellösung	6 Wochen nach 6-OHDA + 3 Monate nach Vehikel (LV6W3M)	8
--	---------------	--	---

2.2 Unilaterale Injektion des 6-OHDA

Vor jeder Operation wurden die Versuchstiere mit einer Mischung aus Ketamin (50 mg/kg KG) und Xylazin (4 mg/kg KG) narkotisiert. Dies wurde intraperitoneal injiziert.

Zur stereotaktischen Injektion wird der Kopf der Wistar-Ratte in einem stereotaktischen Apparat (Kopf®, Tujunga CA, USA) in der "Flat Skull" Stellung fixiert. Dies geschah über 2 Stifte ("Ear-bars"), die in den Gehörgängen eingeführt wurden und einer Klemme für den Oberkiefer ("Tooth-bar"), in die die 2 Inzisivi des Oberkiefers eingehakt wurde.

Unter aseptischen Bedingungen wurden die Ratten zum ersten Mal bei einem Gewicht von 285-305 Gramm operiert. Bei einer einseitigen Läsion (rechts) wurden 4 µl einer 0,1 molaren Zitratpufferlösung mit 24 µg 6-OHDA über 4 Minuten hinweg mit einer 5 µl Hamilton-Spritze injiziert. Die Koordinaten mit Bregma als Referenzpunkt waren: anterior-posterior = - 2,3 mm, lateral = -1,5 mm und ventral = -9,0 mm (Paxinos and Watson, 2007).

2.3 Intrazerebrale Applikation von BoNT-A

Das verwendete BoNT-A wurde in Pulverform von der Firma List Biological Laboratories, INC über den Händler Quadratach Diagnostics bezogen. 6 Wochen nach erfolgreicher 6-OHDA-Läsion wurde den Ratten, die zur Tiergruppe der 6-OHDA-läsionierten und BoNT-A behandelten Ratten (Gruppe LB) gehörten, BoNT-A in das rechte Striatum (ipsilateral der 6-OHDA-Läsion) injiziert. Für die Injektion des BoNT-A wurden die Tiere wie oben beschrieben narkotisiert. Den Ratten der Gruppe LB wurde insgesamt 1 µl BoNT-A-Lösung (BoNT-A gelöst in PBS + 0,1 % BSA) an 2 Injektionsstellen des CPu mit einer Totaldosis von 1 ng BoNT-A injiziert. Danach wurde die Injektionsnadel jeweils noch weitere 4 Minuten an den Koordinaten belassen, um eine ausreichende Diffusion zu erreichen und einen Rückfluss der Injektionslösung zu vermeiden.

Bei der Vehikel-Injektion wurde in beiden Injektionsstellen je 0,5 µl der Vehikellösung (PBS + 0,1 % BSA) injiziert. Die Koordinaten mit dem Referenzpunkt Bregma waren: anterior-posterior = +1,3 mm/-0,4 mm, lateral = -2,6 mm/-3,6 mm und ventral = - 5,5 mm/-5,5 mm (rechtes CPu) (Paxinos and Watson, 2007; Wree et al., 2011).

2.4 Gewebeaufarbeitung

Die Tiere wurden zunächst mittels einer Überdosis Xylazin und Ketamin getötet, welches intraperitoneal appliziert wurde. Für die späteren Untersuchungen wurden die Gehirne entnommen, in Isopentan tiefgefroren (- 50 °C) und bei - 80 °C gelagert. Die Hirne wurde dann mittels Kryostaten/ Gefriermikrotom (Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland) in 20 µm dicke, frontale Parallelschnitte geschnitten. Dafür wurden die Gehirne mit der Medulla oblongata auf einen speziellen Aluminiumstempel mittels Tissue Freezing Medium® (Jung, Deutschland) ausgerichtet und aufgefroren. Dieser Stempel wurde dann auf den Schneidemechanismus des Kryostaten gespannt. Die Schnitte wurden auf die mit Gelatine beschichteten und vortemperierten (-20°C) Glas-Objektträgern übertragen, getrocknet (20-30 min, +35°C) und anschließend zum Lagern in evakuierten Plastikbeuteln tief gefroren und gelagert. Hirnschnitte wurden aus 7 vordefinierter Regionen gewonnen, die das CPu und die anderen für die Untersuchung interessant erscheinenden Areale und Kerngebiete enthielten. Die Koordinaten mit dem Referenzpunkt Bregma für die Schnittebenen waren: Schnitt 1 = +1,56 mm, Schnitt 2 = - 0,36 mm, Schnitt 3 = -0,84 mm, Schnitt 4 = -2,16 mm, Schnitt 5 = - 2,52 mm, Schnitt 6 = -3,60 mm und Schnitt 7 = -5,20 mm (Paxinos and Watson, 2007).

2.5 *in vitro* Rezeptorautoradiographie

Die autoradiographischen Untersuchungen wurden nach veröffentlichten Protokollen im Hirnforschungszentrum Jülich am Institut für Neurowissenschaften und Medizin unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. Karl Zilles, von Markus Cremer und seinen MitarbeiterInnen ausgeführt (Zilles et al. 1991a, 1991b, 1991c, 2002a, 2002b). Für die glutamergen und acetylcholinergen Rezeptoren wurden folgende Liganden zur Bestimmung der RD verwendet: M₁-Rezeptor mit [³H]-Pirenzipin (M₁-Antagonist), M₂-Rezeptor mit [³H]-Oxotremorin (M₂-Agonist) und mit [³H]-AF-DX 384 (M₂-Antagonist), M₃-Rezeptor mit [³H]-4-Damp (M₃-Antagonist), α₄β₂ Nikotin-Rezeptor (nAch) mit [³H]-Epibatidin (α₄β₂-Agonist), NMDA-Rezeptor mit [³H]-MK-801 (NMDA-Antagonist), mGlu 2/3-Rezeptor mit [³H]-LY 341/495 (mGlu 2/3- Agonist) und Kainat-Rezeptor mit [³H]-Kainat (Agonist). Alle Liganden wurden von Perkin Elmer (Rodgau, Deutschland) erworben. Der Autoradiographieprozess der einzelnen Hirnschnitte lief in 3 Hauptschritten ab: Rehydratation und Eliminierung von endogenen Liganden, Inkubation des jeweils tritiumhaltigen Liganden in Abwesenheit (total binding) oder Anwesenheit (nonspecific binding) eines spezifischen nicht radioaktiven Liganden als Verdränger und eine abschließende Spülung, um nicht gebundene Liganden und Puffersalze zu eliminieren. Die Schnitte wurden dann getrocknet und mit Plastik-Standards

(definierte Radioaktivität) gegen β -sensitive Filme (Kodak, PerkinElmer LAS GmbH, Deutschland) für bis zu 15 Wochen exponiert. Die entstandenen Autoradiographien wurden unter Verwendung eines Hyperprozessors (Amersham Biosciences, Amersham, UK; now: GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) entwickelt und mit einer CCD-Kamera (Zeiss, Carl Zeiss Mikrolmaging GmbH, Göttingen, Deutschland) digitalisiert. Details zum Autoradiographieprozess jedes Rezeptors sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Liste der analysierten Rezeptoren mit den jeweils spezifischen Liganden, nicht radioaktiven Verdränger, Wasch- und Inkubationsdetails

Rezeptor	Ligand	Verdrän- ger	Inkubationspuffer	Vorin- kuba- tion	Haupt- inkubation	Schluss- spülung
M1	[³ H]- Piren- zipin 10 nM	Pirenzipin- dehydrat 2 μ M	Modifizierter Krebs Puffer (ph 7,4), (5,6 mM KCL, 30,6 mM NaCl, 1,2 mM MgSO ₄ , 1,4 mM KH ₂ PO ₄ ; 5,6 mM D- Glukose, 5,2 mM NaHCO ₃ 2,5 mM CaCl ₂)	15 min 4°C	60 min 4°C	1) 2 x 1 min 4°C 2) 1s in destilliertes Wasser, 22°C
M2 (Agonist)	[³ H]- Oxo- tremorin 1,7nM	Carbachol 10 μ m	20mM HEPES-Tris (pH 7,5) +10mM MgCl ₂	20 min 22°C	60 min 22°C	1) 2 x 2 min 4°C 2) 1s in destilliertes Wasser, 22°C
M2 (Anta- gonist)	[³ H]-AF- DX 384 5nM	Atropin- sulfat 100 μ M	Modifizierter Krebs Puffer (ph 7,4), (4,7 mM KCL, 120 mM NaCl, 1,2 mM MgSO ₄ , 1,2 mM KH ₂ PO ₄ , 5,6 mM D-Glukose, 25 mM NaHCO ₃ , 2,5 mM CaCl ₂)	15 min 22°C	60 min 22°C	1) 3 x 4 min 4°C 2) 1s in destilliertes Wasser, 22°C
M3	[³ H]-4- Damp 1nM	Atropin- sulfat 10 μ m	50 mM Tris-HCl (pH 7,4) + 0,1 mM PMSF, 1 mM EDTA	15 min 22°C	45 min 22°C	1) 2 x 5 min 4°C 2) 1s in destilliertes Wasser, 22°C
$\alpha_4\beta_2$	[³ H]- Epiba- tidin 0,11nM	Nikotin 100 μ m	15mM Hepes (pH 7,5) + 120 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,8 mM MgCl ₂ , 1,8 mM CaCl ₂	20 min 22°C	90 min 4°C	1) 1 x 5 min 4°C 2) 1s in destilliertes

Material und Methoden

						Wasser, 22°C
Kainat	[³ H]- Kainat 9,4 nM	SYM 2081 100µM	50 mM Tris-acetate (pH 7,1) [+10 mM Ca ²⁺ -acetate]	3x 10min, 4°C	45min, 4°C	1) 3x 4s, 4°C 2) Glutarylal- dehyde in Aceton (100ml/2,5ml) 2x 2s, 22°C
mGlu 2/3	[³ H]-LY 341/495 1nM	L- Glutamat 1mM	Phosphatpuffer (pH 7,6) 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 1,4 mM KH ₂ PO ₄ , 100 MM KBr	2 x 5 min, 22°C	60min, 4°C	1) 2x 5min, 4°C 2) 1s in destilliertes Wasser, 22°C
NMDA	[³ H]- MK-801 3,3 nM	MK-801 100 µm	50mM Tris-Acetat (pH 7,2), 50µM Glutamat, 30 µM Glycin, 50 µM Spermidin	15 min, 4°C	60 min, 22°C	1) 2x 5 min, 4°C 2) destilliertes Wasser, 22°C

2.6 Daten- und Bildverarbeitung

Die densitometrische Bestimmung der RD aus den digitalisierten Hirnschnittbilder wurde mit dem Programm MCID Analysis v7.0 (InterFocus imaging Ltd, Linton, UK) (<http://www.mcid.co.uk/>) durchgeführt. Die Software bietet eine interaktive Benutzeroberfläche, welche manuell durch Maus und Tastatureingaben zu bedienen ist. Dabei präsentiert sich dem Anwender ein zweigeteiltes Interface. Auf der linken Seite kann der Benutzer über diverse Funktionen, graphischen Tools und Operationen in unterschiedlichen Auswahlmenüs verfügen. Ebenfalls bietet der linke Bereich der Benutzeroberfläche Platz für die manuelle Vermessung ausgewählter Einzelbilder. Auf der rechten Seite hingegen sind benutzerdefiniert die einzelnen *Channels* aufgeführt, in welche die entsprechenden Bilderserien geladen werden können. Die Aufteilung der rechten Interfacesseite kann dabei manuelle unter der Option *Settings* und *Display Format* individuell verändert werden. Vor Beginn der Bestimmung der kalibrierten Dichte war dabei die Umstellung von MCID_{TM} in den Modus *Receptor Binding* erforderlich. Dieser musste vor jeder neu beginnenden Sitzung in der Menüleiste unter *Settings* und anschließender Auswahl des Unterpunktes *Study* mit einem Mausklick auf *Receptor Binding* ausgewählt werden, was mit einem Haken hinter der entsprechenden Funktion angezeigt wird. Um mit MCID_{TM} die kalibrierte Dichte aus den autoradiographischen Schnittbildern berechnen zu können, musste zunächst eine linear interpolierte Kalibrierungskurve erstellt werden. Dafür war das *Calibration Icon* in der linken

Menüleiste als Operation und anschließend die Option *Cal stds* (Calibration Standards) auszuwählen. Die *Standards unit* wurde von [nCi/g] auf [fmol/mg] geändert. Dabei beziehen sich Rezeptorkonzentrationen in fmol immer auf mg Protein. Um einen Funktionsgraphen generieren zu können, sind am Hirnforschungszentrum in Jülich ermittelte standardisierte Kalibrierungstabellen verwendet worden. Diese Tabellenwerte wurden in die Kalibrierungsfunktion übernommen und anschließend wurde mittels einer kubischen Spline Funktion der Funktionsgraph erstellt. Dabei konnte nun jedem Grauwert eines Bildes, im Bereich von 0 bis 255, ein entsprechender kalibrierter Dichtewert zugeordnet werden, wobei im Bereich um 0 (dunkel bis schwarz) eine sehr hohe und im Bereich von 255 (hell bis weiß) eine sehr niedrige Dichte erwartet werden kann. Die Kalibrierungskurve war nun auf alle Kanäle zu übernehmen. Der nächste Schritt bestand in der Bestimmung des für jede Bildserie individuellen Hintergrundwertes. Dazu wurde ein *Total Binding* Bild der entsprechenden Bildserie in den Kanal 1 (im Programm mit *Ch1* im *Image View* gekennzeichnet) durch den Befehl *Retrieve Image* im Menüpunkt *Image* der *Standard Bar* geladen, da nur in diesem Kanal aufgrund programmspezifischer Standards, eine Anwendung von Messungen möglich ist. Allerdings musste an dieser Stelle darauf geachtet werden, den Dateityp in der *Retrieve Image* Funktion von „TIFF 5 (*.tif)“ auf „TIFF (*.tif)“ zu ändern, da die zu ladenden Bilddateien im entsprechenden letztgenannten Format abgespeichert waren. Weiterhin war es erforderlich innerhalb der *Components* (direkt unterhalb der Drop-down Auswahl des Dateitypes) alle Haken, mit Ausnahme des *Image*-Häkchens zu entfernen, um so Interferenzen mit den bereits vorkalibrierten Kanälen zu vermeiden. Mit Hilfe der *Clickoutline* Funktion aus der *Image Tools Bar* wurde anschließend ein Hintergrundbereich außerhalb jeglicher anatomische Hirnstrukturen oder Präparationsartefakte manuell umfahren.

Das Programm errechnete nun für diesen Hintergrund eine mittlere kalibrierte Dichte, welche im Folgenden stets von den ermittelten Messwerten aus den Hirnregionen subtrahiert wurde, um Hintergrund-korrigierte Messwerte zu erhalten. Dieser Hintergrundwert wurde als Bilddatei für den Rest der Messung einer Bildserie in den Kanal 2 (im Programm mit *Ch2* im *Image View* gekennzeichnet) dargestellt. Die restlichen Bilder einer Serie konnten nun in die Kanäle 3 bis 8 geladen werden. Um auch diese Schnittbilder einer nachfolgenden RD-Messung zugänglich zu machen, erfolgte zunächst eine Übertragung der Kalibrierung auf die o.g. Kanäle bis zur Position 8 im *Image View*. Die jetzt kalibrierten Bilder einer Serie wurden abschließend im Format „*.im“ gespeichert. Der zweite Schritt vor Beginn der eigentlichen Messung umfasste die korrekte Erstellung der Ergebnistabelle in MCID_{TM}. Dafür wurde im

Seitenmenü die Operation *Sample* ausgewählt, worauf hin bereits voreingestellte Standardtabelle mit vier Spalten angezeigt werden. Um die restlichen Spalten zu ergänzen, wurde unter dem Menüpunkt *Sample* der *Standard Bar* der Unterpunkt *Measures selection* aufgerufen. In dem jetzt angezeigten Programmfenster wurden unter dem Drop-Down Menü *Basic Morphometry* die Parameter *Area* und *Perimeter* mittels Doppelklick ausgewählt und mit dem OK-Button bestätigt. Die graphische Messung der einzelnen Schnittbilder erfolgte nun jeweils für das rechte und linke Hirnareal. Dazu ist ebenfalls mit der zuvor verwendeten Funktion *Click-outline* aus der *Sample Bar* eine kontinuierliche Linie um die auszuwertende Hirnstruktur (z.B. das CPu, der AcB, die CA1/3 usw. der rechten und/oder linken Hemisphäre) gezogen worden, sodass eine geschlossene Fläche konstruiert wurde (Abbildung 13). Präparationsartefakte innerhalb des zu messenden Hirnareals sind hierbei unter Abschätzung geeigneter Konturlinien bei den einzelnen Messungen ausgespart worden (Abbildung 14). Das Programm errechnete aus dem graphischen abgegrenzten Areal eine spezifische kalibrierte Dichte in absoluten und relativen Werten sowie die Pixel für Area und Perimeter und verzeichnete diese in der Ergebnistabelle. Abwechselnd sind so das rechts- und linksseitige Hirnareal von jedem Bild einer Serie vermessen worden. Um eine schlüssige Datenerhebung zu gewährleisten, war darauf zu achten, die vermessenen Bilder mit der verwendeten Kalibrierung und den gesetzten Vermessungslinien zu speichern. Im Anschluss wurde die Ergebnistabelle als „lg2 – Datei“ gespeichert.

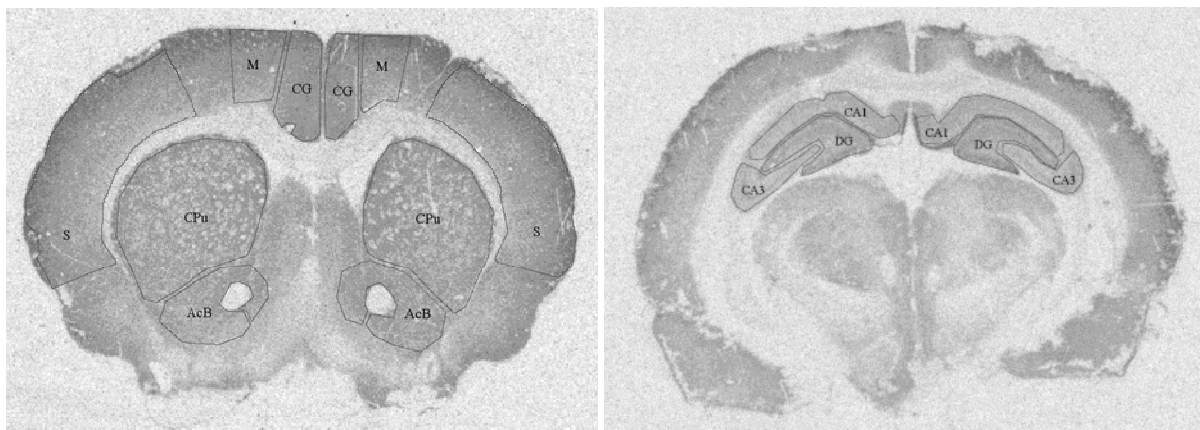


Abbildung 13: Abgrenzung der Hirnareale in den Frontalschnitten für die linke und rechte Hemisphäre

Der linke Schnitt entspricht Schnittebene 1: M ist der motorische Kortex, CG der cinguläre Kortex, S der sensorische Kortex, AcB der Nucleus accumbens und CPu der Caudatus-Putamen Komplex. Der rechte Schnitt zeigt Schnittebene 6: Hier steht CA1 und CA3 für die Cornu ammonis Regionen 1 und 3 und DG für den Gyrus dentatus. Die dargestellten Beispiele für die Abgrenzungen der Hirnareale wurden für alle Rezeptoren, für jeden Schnitt gleich beibehalten.

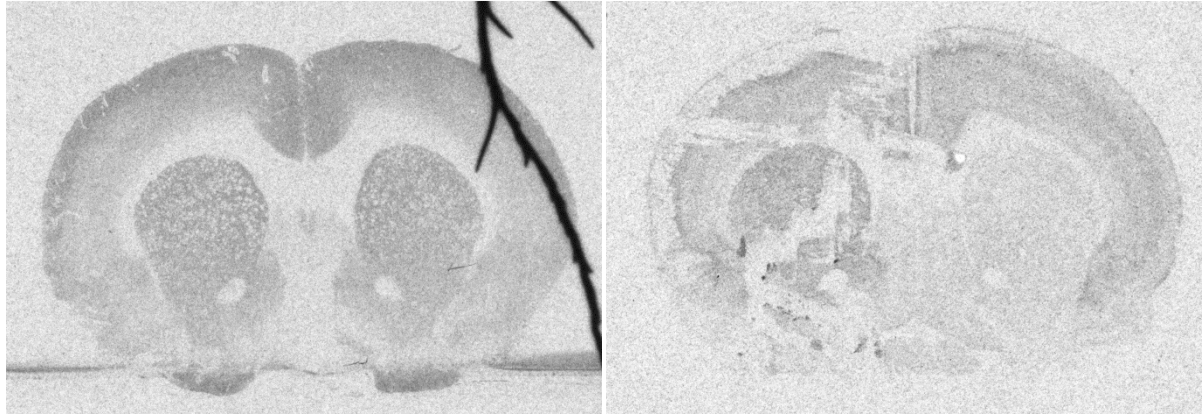


Abbildung 14: Beispiele für Artefakte in Hirnschnitten, die für die Messung der RD ausgespart wurden

Im linken Schnitt erkennt man deutlich ein "Objekt" im Autoradiogramm, das im Bereich des sensorischen Kortex rechts die gemessenen RD-Werte stark erhöhen würde. Der rechte Schnitt zeigt eine stark zerstörte linke Hemisphäre und macht die korrekte Abgrenzung einzelner Hirnareale in dieser Schnittebene unmöglich.

Die mit MCID_{TM} ermittelten Messwerte wurden nach vollständiger Erfassung in das Tabellenkalkulationsprogramm LibreOffice Calc übertragen.

Die gemessenen kalibrierten Dichten/Grauwerte (CG) wurden mit folgender Formel in RD umgerechnet:

$$RD \left[\frac{fmol}{mg} \right] = \frac{CG}{SA \left[\frac{Ci}{mmol} \right]} \times \frac{Kd[nM] + L[nM]}{L[nM]}$$

Die RD (Rezeptordichte) wird ermittelt aus dem mittleren gemessenen kalibrierten Grauwert (CG, der aus MCID in das Tabellenprogramm kopiert wurde), der spezifischen Aktivität (SA), der Dissoziationskonstante (Kd), und der Realkonzentration (L) des jeweiligen Liganden. Die Werte für SA, Kd und L wurden der AUTO_SCAL2C Datei entnommen. SA beschreibt die Strahlungsaktivität des Liganden. Kd gibt die halbmaximale Sättigungskonzentration an und ist ein Richtwert der Ligandenkonzentration im Inkubationsmedium sowie ein Maß für die Affinität des Liganden an seinem Rezeptor. Je kleiner Kd, desto höher ist die Affinität. L beschreibt die tatsächliche Konzentration des Liganden im genutzten Inkubationsmedium.

Für jeden Schnitt einer Bilderserie wurde so die RD für das rechte und linke Hirnareale bestimmt. Ein Mittelwert der 7 Schnitte für dieses Areal wurde gebildet, sodass jedem Tier je eine RD für (z.B.) das rechte und linke CPu zugeordnet wurde. Anschließend wurden die mittleren Dichte-Werte mit der durchschnittlich gemessenen Fläche verknüpft und in Versuchsgruppen zusammengefasst. Das am Ende entstandene Übersichtshistogramm bildet

die mittleren flächengewichteten RD einer Versuchsgruppe für ein Hirnareal mit ihrer Standardabweichung ab.

Anhand der folgenden Formel wurde zusätzlich die relative Rezeptordichte berechnet:

$$\text{Relative Rezeptordichte} = 100 \times \frac{MW \text{ area RD rechts} - MW \text{ area RD links}}{MW \text{ area RD links}}$$

Die Berechnung der relativen RD dient der Darstellung von möglichen Seitendifferenzen zwischen rechten und linken Hirnareal eines Versuchstiers.

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics Version 22.0. Die Gaußglocken-Verteilung der RD wurde mit dem Kolmogrov-Smirnov Test getestet. Anschließend wurden die Daten mit ANOVA (einfaktorielle Varianzanalyse) analysiert. Die abhängige Variable war die RD und die Kovariable war die jeweilige Therapiegruppe getrennt für die rechte und linke Hirnhälfte für jedes Hirnareal. Nach Signifikanznachweis in der ANOVA folgte ein Post-Hoc-Test mit Bonferroni-Korrektur. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 festgelegt, d.h. ab einen p-Wert <0,05 galten Werte als signifikant.

3. Ergebnisse

Die *in vitro* Rezeptorautoradiographie wurde zur Analyse der mittleren Dichte der Rezeptoren verwendet. In dieser Arbeit wird die RD für die Versuchsgruppe LB und LV für glutamerge und acetylcholinerge Rezeptoren gegenüber gestellt. Alle Messwerte, die in den folgenden Abschnitten benannt werden, sind in Tabelle 3 (Anhang) übersichtlich aufgelistet. In den Abbildungen zu jedem Rezeptor werden Seitendifferenzen der einzelnen Versuchsgruppen (LB und LV) dargestellt. Weitere Diagramme der Rezeptoren mit zeitlichen Verläufen innerhalb der Gruppen für die einzelnen Hirnareale sind im Anhang zu finden. Hirnareale, in denen die RD unter 200 fmol/mg lag, wurden zunächst gemessen, aber auf Grund der Ungenauigkeit der Werte hier nicht weiter berücksichtigt. Die Werte der Kontrollgruppe K für die einzelnen Hirnareale (siehe Diagramme im Anhang) wurden bereits von weiteren Doktoranden des Institutes für Anatomie gemessen und für dieses Arbeit übernommen.

3.1 Qualitative Betrachtung der Ergebnisse der Autoradiographie

Die Autoradiogramme eignen sich sehr gut für die Areal- und Lamina-spezifische Darstellungen von Arealen und Kerngebieten des Rattenhirns. Wie in Abbildung 15 für die Schnittebene 1 ersichtlich, lassen sich die einzelnen Areale wie z.B. das AcB, das CPu oder der S sehr gut abgrenzen. Abbildung 15 stellt für jeden Rezeptor ein beispielhaftes digitalisiertes Folienbild dar, um bereits makroskopisch sichtbare Differenzen zwischen rechter und linker Hemisphäre in Schnittebene 1 der Versuchsgruppe LB aufzuzeigen. Es lässt sich ein erster Eindruck zu den unterschiedlichen RD in Abhängigkeit des Grauwertes (je dunkler das "grau", desto höher wird die RD sein) für die einzelnen Hirnareale der Rezeptoren erkennen. So zeigt z.B. der nAch-Rezeptor eine schwächere Färbung im gesamten Hirnschnitt als der M₁- oder der M₃-Rezeptor, was darauf schließen lässt, dass dieser Rezeptor eine geringere RD vorweisen wird. Die glutamergen Rezeptoren weisen ebenfalls eine schwächere Färbung auf, als die mACh-Rezeptoren. Somit kann man davon ausgehen, dass besonders für den M₃-Rezeptor im Rattenkortex hohe RD für eine Vielzahl von Hirnareale zu erwarten ist.

Die signifikantesten Abweichungen speziell zwischen rechter und linker Hemisphäre lassen sich bereits optisch beim nAch-Rezeptor besonders im CPu und AcB erkennen. Es zeigt sich hier auf der mit 6-OHDA läsionierten und anschließend mit BoNT-A therapierten Seite eine deutlich schwächere grau Färbung als auf der unbehandelten linken Hirnhälfte. Die übrigen Rezeptoren weisen keine derart ausgeprägten makroskopisch sichtbaren Abweichungen zwischen rechter und linker Hemisphäre auf.

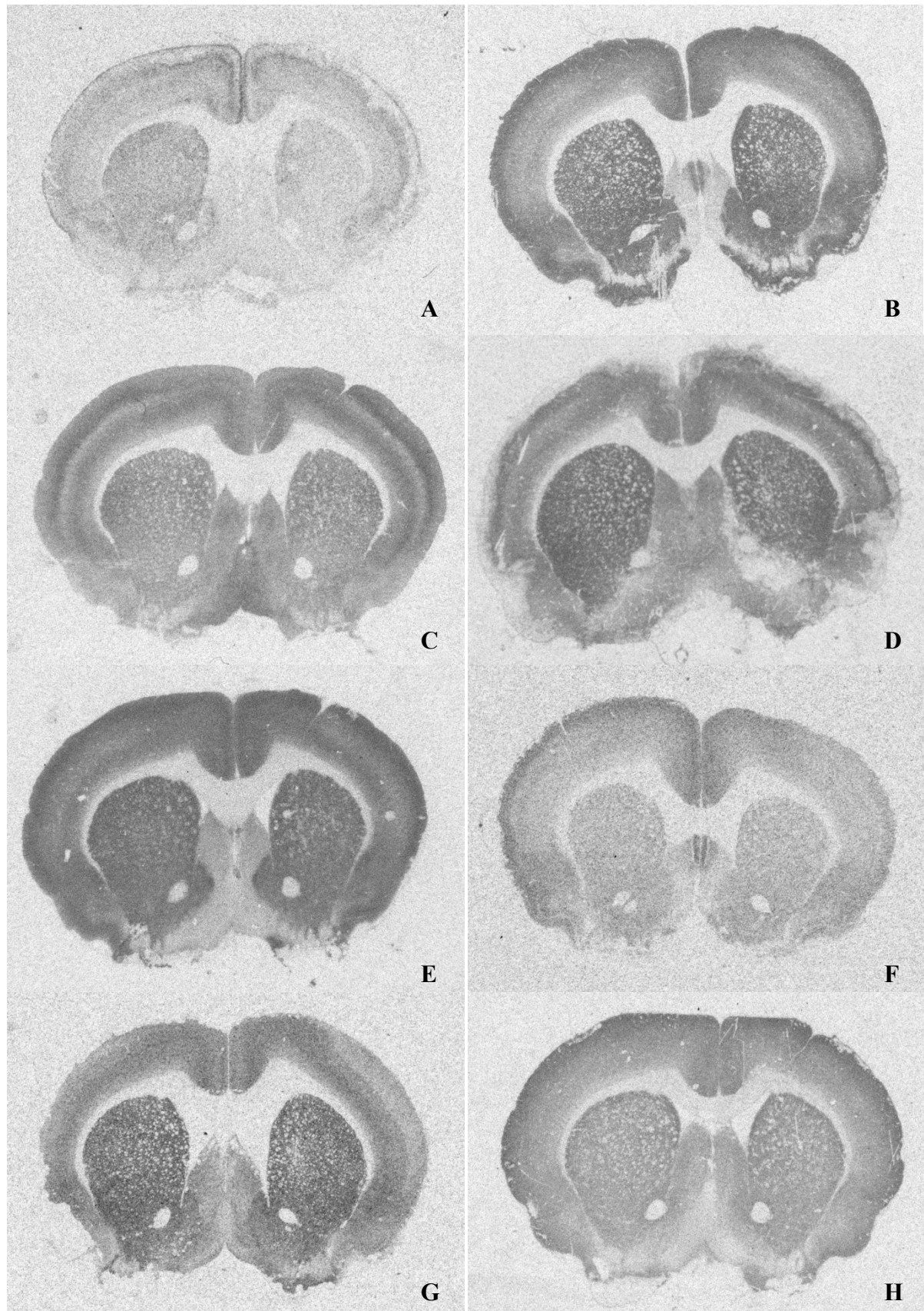


Abbildung 15: Autoradiogramme von Frontalschnitten für die einzelnen Rezeptoren in Hemiparkinson-Ratten 3 Monate nach intrastriateller BoNT-A-Injektion (Versuchsgruppe LB, Schnittebene 1)

Ergebnisse

Der Schnitt A entspricht dem Rezeptor nAch. Man sieht deutliche Veränderungen der Grauwerte im CPu und AcB. Der Schnitt B steht für den M_1 -Rezeptor. Makroskopisch sind keine Abweichungen links zu rechts erkennbar. Der Schnitt C steht für den Agonist des Rezeptor M_2 . Auch hier sind makroskopisch keine rechts-links Differenzen sichtbar. Gleiches gilt für den Antagonist des M_2 -Rezeptors (Schnitt D). Der M_3 -Rezeptor (Schnitt E) zeigt die stärkste Graufärbung und somit die größte zu erwartende RD. Auch hier sind keine Seitenabweichungen erkennbar. Gleiches gilt für die drei glutamergen Rezeptoren NMDA (Schnitt F), Kainat (Schnitt G) sowie mGlu 2/3 (Schnitt H). Ihr Grauwert liegt im Mittel zwischen nAch- und mAch-Rezeptor.

3.2 Quantitative Betrachtung der Rezeptordichten für acetylcholinerge Rezeptoren

3.2.1 nAch-Rezeptor ($[^3H]$ -Epibatidin)

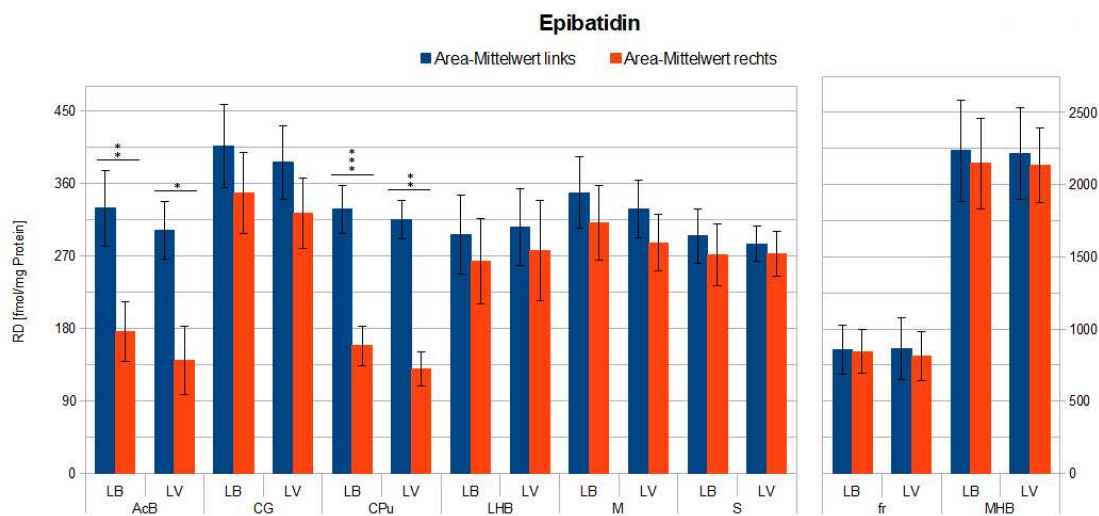


Abbildung 16: Darstellung der mittleren RD für den Ligand $[^3H]$ -Epibatidin des nAch-Rezeptors

Die mittlere RD in fmol/mg Protein ist hier für die Versuchsgruppen LV und LB im Vergleich, jeweils für die linke und rechte Hemisphäre je Hirnareal, dargestellt. Die Tiere der Gruppe LB sind dabei 6-OHDA läsiert und mit BoNT-A therapiert. Tiere der Gruppe LV sind läsiert und mit einer Vehikellösung scheinbehandelt. Alle Daten stellen den Mittelwert \pm SD dar. Die statistische Analyse erfolgte mit post hoc ANOVA. Mit Sternchen markierte sind interhemisphärische Signifikanzen, dabei steht * für $p \leq 0,05$, ** für $p \leq 0,01$ und *** für $p \leq 0,001$. Die einzelnen Werte sind im folgenden Text erläutert.

Wie in Abbildung 16 angedeutet, konnte nur für die Hirnareale CPu und AcB interhemisphärisch signifikante Werte ermittelt werden, alle übrigen Werte sind nicht signifikant. Auch bei einem Vergleich der Werte LV rechts zu LB rechts je Hirnareal konnten keine Signifikanzen ermittelt werden. Im einzelnen ergaben sich folgende Werte:

CPU: Im Hirnareal CPu liegt die mittlere RD der Gruppe K bei 382 ± 25 fmol/mg (Mittelwert \pm Standardabweichung [SD]) (Abb. 24 Anhang). Hier ist keine signifikante rechts-links Differenz zu verzeichnen (-2,3%). In der Gruppe LV beträgt die Abweichung signifikante -

58,9% (Abb. 16) und ist in Abhängigkeit der Überlebenszeit nur leicht gestiegen: 1 Monat (M) = -54,1% und 3M = -63,8% (Abb. 24 Anhang). Die rechts-links Differenz der Gruppe LB beträgt -51,8% (Abb. 16) und ist somit im Verhältnis zur LV um 7,1% gesunken, aber dennoch signifikant. Die Dichtewerte bei längerer Überlebenszeit betragen: 1M = -41,2%, 3M = -53,7%, 6M = -51,4% und 9M = -52,5% (Abb. 24 Anhang). Zu Beginn ist eine größere Wirkung des BoNT-A auf die RD zu verzeichnen.

M: Für das Hirnareal M ist die mittlere RD der Gruppe K 394 ± 28 fmol/mg (Abb. 24 Anhang). Die rechts-links Differenz ist hier -5,4% und nicht signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV betragen -12,9% (Abb. 16) und über die Überlebenszeit der Ratten betrachtet, ergaben sich folgende konstante Werte: 1M = -12,1% und 3M = -13,7% (Abb. 24 Anhang). Die Differenz der Gruppe LB beträgt dagegen -10,7% (Abb. 16) und ist damit etwas geringer als bei den LV-Ratten. In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen in den Dichtewerten ermittelt: 1M = -9,8%, 3M = -11,5%, 6M = -7,9% und 9M = -9,5% (Abb. 24 Anhang). Damit bleiben die Werte nach BoNT-Injektion konstant.

AcB: Die mittlere RD pro Fläche für den Rezeptor nACh im AcB der Versuchsgruppe K liegt bei 377 ± 35 fmol/mg (Abb. 24 Anhang). Dabei wurden keine rechts-links Differenzen festgestellt (-0,5%). Eine signifikante Abweichung zwischen rechter und linker Hemisphäre von -53,6% der mittleren RD wurde erst in der Versuchsgruppe LV festgestellt (Abb. 16). Die Dichtewerte bei längerer Überlebenszeit blieben konstant bei: 1M = -52,9% Abweichung und 3M = -45,5% (Abb. 24 Anhang). Die Differenz zwischen rechter und linker Hemisphäre bei LB-Ratten ist mit -46,6% um 7% geringer als bei den LV-Ratten (Abb. 16). Das heißt, dass die RD nach BoNT-A-Injektion um 7% gestiegen ist im Vergleich zu den LV-Ratte. Hier sieht man Veränderungen der Dichtewerte bei längerer Überlebenszeit. Es ist festzustellen, dass mit dem Alter der Ratten die 6-OHDA induzierten Abweichungen zur kontralateralen Seite durch BoNT-A-Injektion anfangs sinken, dann wieder steigen und nach 9 Monaten sich wieder reduzieren: 1M = -35,7%, 3M = -48,3%, 6M = -49,4% und 9M = -42,2% (Abb. 24 Anhang). Insgesamt ist eine Reduzierung der Differenz nach BoNT-A-Injektion zur Gruppe LV zu verzeichnen. Die Vehikel-Injektion beeinflusst die nACh RD nicht.

CG: In der CG-Region beträgt die mittlere RD für nACh in Kontrollen $469 \pm 40,5$ fmol/mg (Abb. 24 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (-2,1%). In der Gruppe LV ist eine Differenz zur 6-OHDA läsierten Seite von -16,2% zu verzeichnen (Abb. 16). Im Bezug auf die Überlebenszeit ergaben sich folgende Abweichungen: 1M = -17,3% und 3M =

-15,1% (Abb. 24 Anhang). Dagegen sinkt die Differenz in der Gruppe LB leicht auf -14,4% (Abb. 16). Das heißt, dass die RD dort gerade um 1,8% zur Gruppe LV gestiegen ist. Im einzelnen beträgt dies: 1M = -11,4%, 3M = -17,0%, 6M = -9,7% und 9M = -16,6% (Abb. 24 Anhang). Es ist eine leichte Verbesserung der RD durch BoNT-A-Injektion zu erkennen, die bei längerer Überlebenszeit sinkt.

S: In der S-Region beträgt die mittlere RD der Gruppe K 341 ± 31 fmol/mg (Abb. 24 Anhang), mit keiner erheblichen rechts-links Differenz (-0,9%). Bei der Gruppe LV ist eine Differenz von -4,3% zu verzeichnen (Abb. 16). In den jeweiligen Altersgruppen betrachtet, ergibt dies folgende konstante Abweichungen: 1M = -4,5% und 3M = -4,3% (Abb. 24 Anhang). Dagegen steigt die Differenz in der Gruppe LB leicht auf -7,8% (Abb. 16). Das heißt, dass die RD dort um schwache 3,5% gesunken ist. Im einzelnen beträgt dies: 1M = -14,3%, 3M = -15,7%, 6M = -9,2% und 9M = +3,3% (Abb. 24 Anhang). Es ist eine leichte Verbesserung der RD nach BoNT-A-Injektion nach 9 Monaten zu erkennen.

MHB: In der MHb-Region beträgt die mittlere RD der Gruppe K für nAch 3152 ± 452 fmol/mg (Abb. 24 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (-1,7%). Bei der Gruppe LV ist eine Differenz zur 6-OHDA läsionierten Seite von -3,8% zu verzeichnen (Abb. 16). In den jeweiligen Altersgruppen betrachtet, ergibt dies folgende Abweichungen: 1M = -1,7% und 3M = -6% (Abb. 24 Anhang). Die Differenz in der Gruppe LB beträgt -3,9% (Abb. 16). Das heißt, dass die RD im Vergleich zur LV Gruppe konstant blieb. Im einzelnen beträgt dies: 1M = -3,1%, 3M = -3,9%, 6M = -6,6% und 9M = -2,2% (Abb. 24 Anhang). Es ist eine leichte Verbesserung der RD nach BoNT-A-Injektion zu erkennen, die bei längerer Überlebenszeit zunächst sinkt. Im MHb ist die RD des nAch-Rezeptors am größten.

LHb: Im Hirnareal LHb liegt für die Gruppe K die mittlere RD bei 312 ± 36 fmol/mg (Abb. 24 Anhang). Auch hier ist keine signifikante rechts-links Differenz zu verzeichnen (-3,8%). In der Gruppe LV beträgt die Abweichung -9,5% (Abb. 16) und ist in Abhängigkeit der Überlebenszeit nur sehr leicht gestiegen: 1M = -9% und 3M = -10,2% (Abb. 24 Anhang). Die rechts-links Differenz der Gruppe LB beträgt -11% (Abb. 16). Die Dichtewerte schwanken leicht in Abhängigkeit der Überlebenszeit: 1M = -5,6%, 3M = -17,3%, 6M = -6,5% und 9M = -18,7% (Abb. 24 Anhang). Zu Beginn ist eine größere Wirkung des BoNT-A auf die RD zu verzeichnen.

Fr: Für das Hirnareal fr (Fasciculus retroflexus) ist die mittlere RD der Gruppe K 725 ± 79 fmol/mg (Abb. 24 Anhang). Die rechts-links Differenz beträgt hier -4,6% und ist damit nicht

signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV betragen schwache -5,8% (Abb. 16) und über die Überlebenszeit der Ratten betrachtet, ergaben sich folgende Werte: 1M = +2,3% und 3M = -14,5% (Abb. 24 Anhang). Die Differenz der Gruppe LB beträgt dagegen -1,5% (Abb. 16) und ist damit geringer als bei den LV-Ratten. In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen bei den Dichtewerten ermittelt: 1M = +0,5%, 3M = -2,2%, 6M = +3,8% und 9M = -4,6% (Abb. 24 Anhang). Hier ist festzustellen, dass die RD nach BoNT-A-Applikation bis nach 6 Monaten über den Wert der linken Hemisphäre ansteigt und sich nach 9 Monaten verringert, d.h. die BoNT-A-Wirkung nachlässt.

3.2.2 M₁-Rezeptor ([³H]-Pirenzipin)

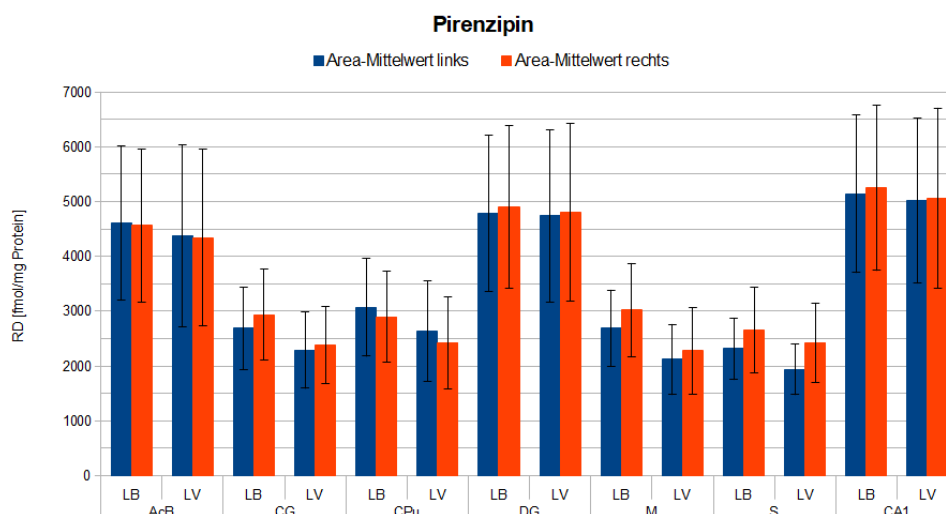


Abbildung 17: Darstellung der mittleren RD für den Liganden [³H]-Pirenzipin des M₁-Rezeptors

Die mittlere RD in fmol/mg Protein ist hier für die Versuchsgruppen LB (6-OHDA und BoNT) und LV (6-OHDA und Vehikellösung) im Vergleich dargestellt, jeweils für die linke und rechte Hemisphäre, je Hirnareal. Alle Daten stellen den Mittelwert \pm SD dar. Es wurden keine signifikanten Werte mittels post hoc ANOVA ermittelt.

Wie in Abbildung 17 ersichtlich, konnten interhemisphärisch keine signifikanten Werte ermittelt werden. Auch bei einem Vergleich der Werte LV rechts zu LB rechts je Hirnareal wurden keine Signifikanzen gemessen. Im einzelnen konnten folgende Ergebnisse ermittelt werden:

CPu: Für das Hirnareal CPu ist die mittlere RD in den Kontrollen 3059 ± 1425 fmol/mg (Abb. 25 Anhang). Die rechts-links Differenz ist -1,4% und damit nicht signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV beträgt -7,8% (Abb. 17) und über die Überlebenszeit der Ratten betrachtet, ergaben sich folgende konstante Werte: 1M = -7% und 3M = -8,4%. Die Differenz der Gruppe LB beträgt dagegen -5,6% (Abb. 17) und ist damit geringer als bei

den LV-Ratten. Die RD hat um 2,2% zugenommen. In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen bei den Dichtewerten ermittelt: 1M = -8,4%, 3M = -5,2%, 6M = -3,6% und 9M = -2,6% (Abb. 25 Anhang). Damit steigen die RD-Werte nach BoNT-A-Injektion leicht an, bis 9 Monate Überlebenszeit.

M: Im Hirnareal M liegt die mittlere RD der Gruppe K bei 2658 ± 1242 fmol/mg (Abb. 25 Anhang). Auch hier ist keine signifikante rechts-links Differenz zu verzeichnen (+5,2%). In der Gruppe LV beträgt die Abweichung +7,4% (Abb. 17) und ist in Abhängigkeit der Überlebenszeit leicht gestiegen: 1M = -1,9% und 3M = +14,3% (Abb. 25 Anhang). Die rechts-links Differenz der Gruppe LB beträgt +12,3% (Abb. 17) und ist somit im Verhältnis zur Gruppe LV gestiegen. Die Dichtewerte bei längerer Überlebenszeit sind: 1M = +13,9%, 3M = +17,7%, 6M = +16,3% und 9M = +8,9% (Abb. 25 Anhang). Zu Beginn ist eine stärkere Wirkung des BoNT-A auf die RD zu verzeichnen, die mit der Überlebenszeit sinkt.

AcB: Für das Hirnareal AcB ist die mittlere RD der Gruppe K für den M_1 -Rezeptor 4403 ± 2086 fmol/mg (Abb. 25 Anhang). Die rechts-links Differenz ist +3,5% und damit nicht signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV betragen -0,9% (Abb. 17) und über die Überlebenszeit der Ratten betrachtet, ergaben sich folgende konstante Werte: 1M = -1% und 3M = -0,8% (Abb. 25 Anhang). Die Differenz der Gruppe LB beträgt dagegen -0,9% (Abb. 17). Damit ist die RD gleich der RD der LV-Ratten. In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen bei den Dichtewerten ermittelt: 1M = -4,1%, 3M = +3,1%, 6M = -4,7% und 9M = +1,7% (Abb. 25 Anhang). Damit bleiben die Werte nach BoNT-A-Injektion relativ konstant und haben nach 3 Monate ihren Höhepunkt.

CG: Für das Hirnareal CG ist die mittlere RD der Gruppe K 2448 ± 1216 fmol/mg (Abb. 25 Anhang). Die rechts-links Differenz ist -1,6% und damit nicht signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV beträgt +4,1% (Abb. 17) und in Abhängigkeit der Überlebenszeit betrachtet, ergaben sich folgende konstante Werte: 1M = +3,5% und 3M = +4,5% (Abb. 25 Anhang). Die Differenz der Gruppe LB beträgt dagegen +9,3% (Abb. 17) und ist damit höher als bei den LV-Ratten. In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen in den Dichtewerten ermittelt: 1M = +11,6%, 3M = +15,6%, 6M = +11% und 9M = +7,9% (Abb. 25 Anhang). Hier ist festzustellen, dass die RD nach BoNT-A-Injektion zunächst steigt, dann abnimmt.

S: Die mittlere RD für das Areal S beträgt 2134 ± 973 fmol/mg in den Kontrollen (Abb. 25 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (+13%). Die Abweichung der

Gruppe LV beträgt dabei +25,3% (Abb. 17). Die Dichtewerte bei längerer Überlebenszeit betrugen: 1M = +15,8% und 3M = +34,6% (Abb. 25 Anhang). In der Gruppe LB wurde im Mittel ebenfalls eine kleine Differenz (+14,9%) festgestellt (Abb. 17). Hier waren die Dichtewerte in Abhängigkeit des Alters der Ratten: 1M = +10,8%, 3M = +11,7%, 6M = +6,3% und 9M = +15% (Abb. 25 Anhang). Nach BoNT-A-Injektion ist hier ein geringer Anstieg über den Ausgangswert zu verzeichnen, der relativ konstant bleibt.

DG: Für das Hirnareal DG beträgt die mittlere RD der Gruppe K 4303 ± 2211 fmol/mg (Abb. 25 Anhang). Hier ist die rechts-links Differenz +0,3% (nicht signifikant). Es ist keine größere rechts-links Abweichung in der Gruppe LV feststellbar (+1,3%) (Abb. 17). Nach 1 Monat war dabei der Unterschied bei +0,8% und nach 3 Monate bei +1,7% (Abb. 25 Anhang). Auch die Differenz nach BoNT-A-Injektion ist im Mittel mit +2,4% (Abb. 17) nicht signifikant. Über längere Zeit gesehen, wurden folgende Abweichungen gemessen: 1M = +1,9%, 3M = +3,6%, 6M = +3,8% und 9M = +2,2% (Abb. 25 Anhang). Es zeigt sich, dass nach BoNT-A-Injektion die RD im Vergleich zur linken Hemisphäre über den Ausgangswert erhöht ist und in Abhängigkeit der Überlebenszeit nach 9 Monate wieder sinkt.

CA1: Die mittlere RD für das Areal CA1 beträgt in den Kontrollen 4526 ± 2267 fmol/mg (Abb. 25 Anhang) bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (+3,1%). Die Abweichung der Gruppe LV beträgt dabei geringe +0,9% (Abb. 17). Die Dichtewerte bei längerer Überlebenszeit waren konstant: 1M = +0,8% und 3M = +0,9% (Abb. 25 Anhang). Bei der Gruppe LB hat man im Mittel eine höhere rechts-links Differenz ermittelt als in der Gruppe LV (+2,2%) (Abb. 17). Hier waren die Dichtewerte in Abhängigkeit des Alters der Ratten: 1M = +4%, 3M = +3,3%, 6M = +4,9% und 9M = 0% (Abb. 25 Anhang). Nach BoNT-A-Injektion ist hier ein leichter Anstieg der RD zu verzeichnen, der nach 9 Monate abnimmt.

3.2.3 M₂-Rezeptor (³H)-Oxotremorin-M)

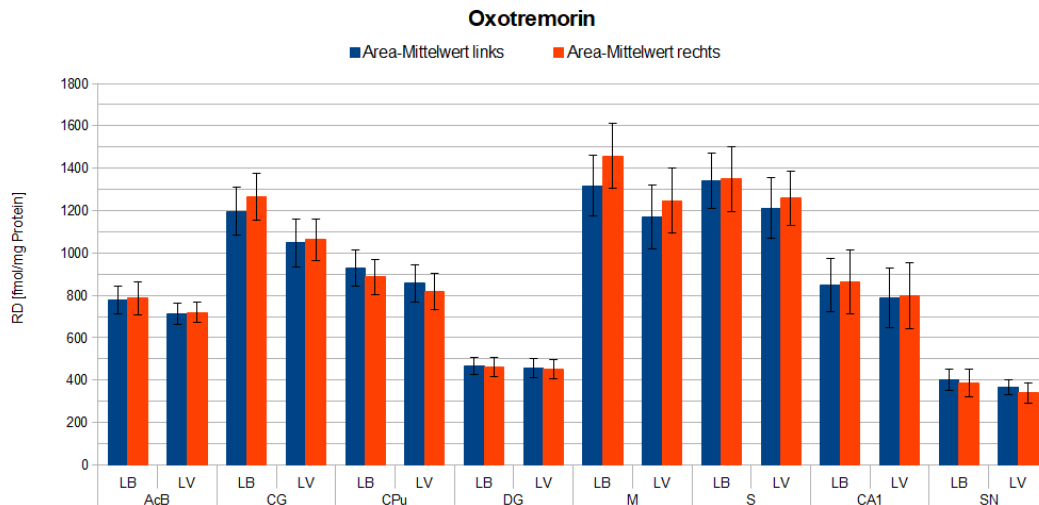


Abbildung 18: Darstellung der mittleren RD für den Agonist [³H]-Oxotremorin des M₂-Rezeptors

Dargestellt ist die mittlere RD in fmol/mg Protein für die Versuchsgruppen LB (6-OHDA und BoNT) und LV (6-OHDA und Vehikellösung) im Vergleich, jeweils für die linke und rechte Hemisphäre, je Hirnareal. Alle Daten stellen den Mittelwert \pm SD dar. Es wurden keine signifikanten Werte mittels post hoc ANOVA ermittelt.

Wie in Abbildung 18 ersichtlich, konnten interhemisphärisch keine signifikanten Werte ermittelt werden. Auch bei einem Vergleich der Werte LV rechts zu LB rechts je Hirnareal wurden keine Signifikanzen gemessen. Im einzelnen ergaben sich für den Agonisten des M₂-Rezeptors folgende Werte:

SN: Im Hirnareal SN beträgt die mittlere RD 301 ± 43 fmol/mg in den Kontrollen (Abb. 26 Anhang). Die rechts-links Differenz ist +4,1% und damit nicht signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV beträgt -7,9% (Abb.18) und über die Überlebenszeit der Ratten betrachtet, ergaben sich folgende konstante Werte: 1M = -10,3% und 3M = -5,4% (Abb. 26 Anhang). Die Differenz der Gruppe LB beträgt dagegen -3,9% (Abb. 18) und ist damit geringer als bei den LV-Ratten und die RD hat um 4% zugenommen. In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen bei den Dichtewerten ermittelt: 1M = -8,3%, 3M = -5,5%, 6M = -3,7% und 9M = +6,9% (Abb. 26 Anhang). Damit steigen die Werte nach BoNT-A-Injektion über die 9 Monate. Die RD ist sehr gering.

CPu: Für das Hirnareal CPu ist die mittlere RD der Gruppe K 904 ± 97 fmol/mg (Abb. 26 Anhang). Die rechts-links Differenz ist +6% und damit nicht signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV beträgt -4,7% (Abb. 18) und über die Überlebenszeit der Ratten betrachtet, ergaben sich folgende Werte: 1M = -5% und 3M = -4,3% (Abb. 26 Anhang). Die

Differenz der Gruppe LB beträgt dagegen -4,5% (Abb. 18) und ist damit ähnlich den LV-Ratten. In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen in den Dichtewerten ermittelt: 1M = -10,4%, 3M = -6,8%, 6M = +0,9% und 9M = -1,1% (Abb. 26 Anhang). Hier ist festzustellen, dass die RD nach BoNT-A-Injektion steigt.

M: In der M-Region beträgt die mittlere RD der Gruppe K 1225 ± 125 fmol/mg (Abb. 26 Anhang), mit keiner signifikanten rechts-links Differenz (+3,1%). In der Gruppe LV ist eine Differenz zur 6-OHDA läsionierten Seite von +6,3% zu verzeichnen (Abb. 18). Für die jeweiligen Altersgruppen betrachtet, ergab dies folgende Abweichungen: 1M = +10,4% und 3M = +3% (Abb. 26 Anhang). Dagegen ist die Differenz in der Gruppe LB leicht auf +10,8% über den linken Wert gestiegen (Abb. 18). Das heißt, dass die RD dort gerade um 4,5% gestiegen ist. Im Einzelnen beträgt dies: 1M = +12,2%, 3M = +17,2%, 6M = +13,1% und 9M = +9,2% (Abb. 26 Anhang). Es ist eine leichte Verbesserung der RD durch BoNT-A-Injektion zu erkennen, die bei längerer Überlebenszeit konstant bleibt.

AcB: Für das Hirnareal AcB ist die mittlere RD für den Agonist des M_2 -Rezeptor 742 ± 65 fmol/mg in den Kontrollen (Abb. 26 Anhang). Die rechts-links Differenz beträgt hier +5,4% und ist damit nicht signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV beträgt +1% (Abb. 18) und über die Überlebenszeit der Ratten betrachtet, ergaben sich folgende konstante Werte: 1M = -1,3% und 3M = +3% (Abb. 26 Anhang). Die Differenz der Gruppe LB beträgt dagegen +1,1% (Abb. 18). Damit ist die RD nahezu gleich der der LV-Ratten. In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen in den Dichtewerten ermittelt: 1M = -0,6%, 3M = +2,9%, 6M = +1% und 9M = +2,4% (Abb. 26 Anhang). Damit bleiben die Werte nach BoNT-A-Injektion relativ konstant um den Wert der linken Hemisphäre. Die allgemeine RD ist relativ gering.

CG: Die mittlere RD für das Areal CG beträgt 1099 ± 83 fmol/mg in den Kontrollen (Abb. 26 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (-0,6%). Die Abweichung der Gruppe LV beträgt dabei +1,5% (Abb. 18). Die Dichtewerte bei längerer Überlebenszeit betrugen: 1M = +3,2% und 3M = -0,1% (Abb. 26 Anhang). In der Gruppe LB hat man im Mittel eine höhere rechts-links Differenz ermittelt als für die Gruppe LV (+5,7%) (Abb. 18). Hier waren die Dichtewerte in Abhängigkeit des Alters der Ratten: 1M = + 8,7%, 3M = +9,4%, 6M = +8% und 9M = +3,9% (Abb. 26 Anhang). Nach BoNT-A-Injektion ist zunächst ein leichter Anstieg der RD zu verzeichnen, der mit der Zeit sinkt.

S: Im Hirnareal S liegt die mittlere RD der Gruppe K bei 1297 ± 139 fmol/mg (Abb. 26 Anhang). Auch hier ist keine starke rechts-links Differenz zu verzeichnen (+8,6%). In der Gruppe LV beträgt die Abweichung +3,9% (Abb. 18) und ist in Abhängigkeit der Überlebenszeit nur leicht gestiegen: 1M = +3,3% und 3M = +4,5% (Abb. 26 Anhang). Die rechts-links Differenz der Gruppe LB beträgt +0,6% (Abb. 18) und ist somit im Verhältnis zur Gruppe LV gesunken. Die Dichtewerte bei längerer Überlebenszeit sind: 1M = +0,5%, 3M = -4,6%, 6M = -1% und 9M = +1,1% (Abb. 26 Anhang). Zu Beginn ist eine geringere Wirkung des BoNT-A auf die RD zu verzeichnen, die mit der Überlebenszeit sehr leicht steigt.

DG: Die mittlere RD für das Areal DG beträgt 433 ± 61 fmol/mg in den Kontrollen (Abb. 26 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (-0,9%). Die Abweichung in der Gruppe LV beträgt dabei -1,5% (Abb. 18). Die Dichtewerte bei längerer Überlebenszeit betragen: 1M = -2,6% und 3M = -0,6% (Abb. 26 Anhang). In der Gruppe LB hat man im Mittel ebenfalls keine signifikante rechts-links Differenz (-1%) (Abb. 18). Hier waren die Dichtewerte in Abhängigkeit des Alters der Ratten: 1M = +0,3%, 3M = -0,8%, 6M = -0,6% und 9M = -1,6% (Abb. 26 Anhang). Nach BoNT-A-Injektion ist hier zunächst ein geringer Anstieg zu verzeichnen, der dann unter den Wert der linken Hemisphäre sinkt.

CA1: Für das Hirnareal CA1 beträgt die mittlere RD der Gruppe K 670 ± 88 fmol/mg (Abb. 26 Anhang). Hier ist die rechts-links Differenz 2% (nicht signifikant). Es ist keine größere Abweichung in der Gruppe LV festzustellen (1%) (Abb. 18). Nach 1 Monat war dabei der Unterschied bei 1,4% und nach 3 Monate bei 0,7% (Abb. 26 Anhang). Auch die Differenz nach BoNT-A-Injektion ist im Mittel mit 1,8% nicht signifikant (Abb. 18). Über längere Zeit gesehen, wurden folgende Abweichungen gemessen: 1M = 3,8%, 3M = 4,1%, 6M = 1,5% und 9M = 0,2% (Abb. 26 Anhang). Es zeigt sich, dass nach BoNT-A-Injektion die RD im Vergleich zur linken Hemisphäre über den Wert der linken Hemisphäre erhöht ist und in Abhängigkeit der Überlebenszeit sinkt.

3.2.4 M₂-Rezeptor (³H)-AF-DX 384)

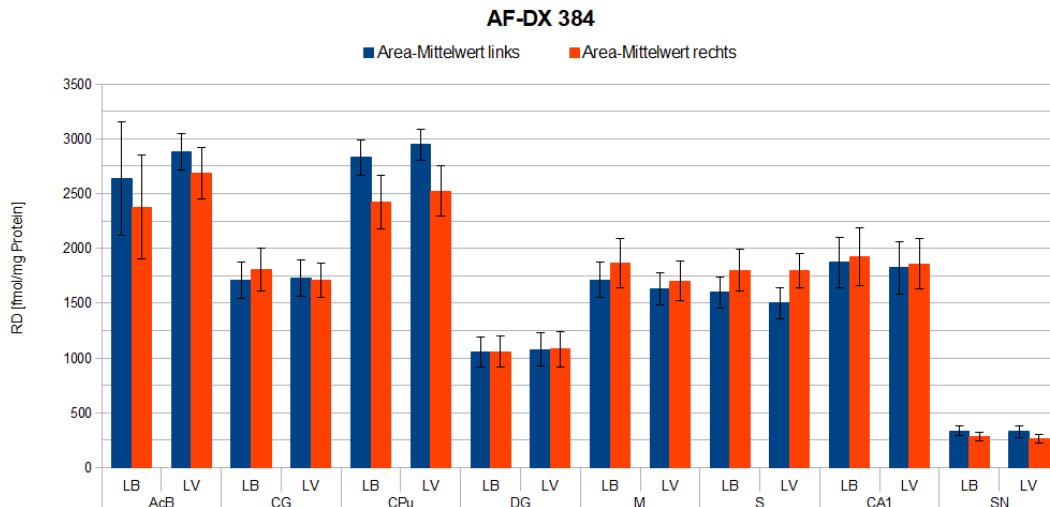


Abbildung 19: Darstellung der mittleren RD für den Antagonist [³H]-AF-DX 384 des M₂-Rezeptors

Dargestellt ist die mittlere RD in fmol/mg Protein für die Versuchsgruppen LB (6-OHDA und BoNT-A) und LV (6-OHDA und Vehikellösung) im Vergleich, jeweils für die linke und rechte Hemisphäre, je Hirnareal. Alle Daten stellen den Mittelwert \pm SD dar. Es wurden keine signifikanten Werte mittels post hoc ANOVA ermittelt.

Wie in Abbildung 19 ersichtlich, konnten interhemisphärisch keine signifikanten Werte ermittelt werden. Auch bei einem Vergleich der Werte LV rechts zu LB rechts je Hirnareal wurden keine Signifikanzen gemessen. Im einzelnen wurden für den Antagonisten des M₂-Rezeptors folgende Ergebnisse ermittelt:

SN: Im SN beträgt die mittlere RD für M2 348 ± 32 fmol/mg in den Kontrollen (Abb. 27 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (-1,7%). In der Gruppe LV ist eine Differenz zur läsierten Seite von -19,5% zu verzeichnen (Abb. 19). In den jeweiligen Altersgruppen betrachtet, ergibt dies folgende Abweichungen: 1M = -21,8% und 3M = -17,6% (Abb. 27 Anhang). Die Differenz in der Gruppe LB ist mit -14,3% ähnlich (Abb. 19). Die RD ist im Vergleich zur Gruppe LV nur leicht gestiegen. Im Einzelnen beträgt dies: 1M = -15,5%, 3M = -10,7%, 6M = -10,9% und 9M = -8,6% (Abb. 27 Anhang). Es ist eine leichte Verbesserung der RD nach BoNT-A-Injektion zu erkennen, die bei längerer Überlebenszeit sinkt. Im SN ist die RD sehr gering, was Schwankungen in den Ergebnissen verursacht.

CPu: Im Hirnareal CPu liegt die mittlere RD bei 3557 ± 315 fmol/mg für die Gruppe K (Abb. 27 Anhang). Auch hier ist keine signifikante rechts-links Differenz zu verzeichnen (+1,6%). In der Gruppe LV beträgt die Abweichung -14,3% (Abb. 19) und ist in Abhängigkeit der Überlebenszeit nur leicht gestiegen: 1M = -13,5% und 3M = -15,1% (Abb. 27 Anhang). Die

rechts-links Differenz der Gruppe LB beträgt -14,4% (Abb. 19) und ist somit im Verhältnis zur LV konstant geblieben. Die Dichtewerte bei längerer Überlebenszeit sind: 1M = -22,7%, 3M = -16,8%, 6M = -10,2% und 9M = -6,8% (Abb. 27 Anhang). Zu Beginn ist eine geringere Wirkung des BoNT-A auf die RD zu verzeichnen, die mit der Überlebenszeit steigt.

M: Für das Hirnareal M ist die mittlere RD 1950 ± 196 fmol/mg in der Gruppe K (Abb. 27 Anhang). Die rechts-links Differenz beträgt hier +6,8% und ist damit nicht signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV beträgt +4,4% (Abb. 19) und über die Überlebenszeit der Ratten betrachtet, ergaben sich folgende konstante Werte: 1M = +2,1% und 3M = +4% (Abb. 27 Anhang). Die Differenz der Gruppe LB beträgt dagegen +9% (Abb. 19). Damit ist die RD höher als bei den LV-Ratten. In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen bei den Dichtewerten ermittelt: 1M = +6,3%, 3M = +6,3%, 6M = +17,9% und 9M = +11,4% (Abb. 27 Anhang). Damit bleiben die Werte nach BoNT-A-Injektion relativ konstant über den Wert der linken Hemisphäre.

AcB: Die mittlere RD für den Antagonisten des M_2 -Rezeptors im AcB liegt bei 3443 ± 275 fmol/mg in den Kontrollen (Abb. 27 Anhang), dabei wurden keine signifikanten rechts-links Differenzen festgestellt (+5,7%). Eine leichte Abweichung von -6,6% der mittleren RD wurde in der Versuchsgruppe LV festgestellt (Abb. 19). Die Dichtewerte nach längerer Überlebenszeit blieben konstant bei: 1M = -7,7% Abweichung und 3M = -5,6% (Abb. 27 Anhang). Die Differenz zwischen rechter und linker Hemisphäre bei LB-Ratten ist mit -9,9% um schwache 3,3% im Mittel höher als bei den LV-Ratten (Abb. 19). Auch hier sieht man Veränderungen der Dichtewerte nach längerer Überlebenszeit. Es ist festzustellen, dass sich die BoNT-A-Wirkung auf die RD erst nach 9 Monaten zeigt: 1M = -12,8%, 3M = 12,7%, 6M = -17,1% und 9M = -3,2% (Abb. 27 Anhang). Die Vehikel-Injektion beeinflusst die RD nicht. Die RD im AcB ist allgemein hoch.

CG: In der CG-Region beträgt die mittlere RD der Gruppe K 1807 ± 177 fmol/mg (Abb. 27 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (-3,3%). In der Gruppe LV ist eine Differenz zur 6-OHDA läsierten Seite von -0,9% zu verzeichnen (Abb. 19). Für die jeweiligen Altersgruppen betrachtet, ergaben sich folgende Abweichungen: 1M = -2,4% und 3M = -0,4% (Abb. 27 Anhang). Dagegen ist die Differenz in der Gruppe LB leicht auf +5,6% gestiegen (Abb. 19). Das heißt, dass die RD dort gerade 6,5% gestiegen ist. Im einzelnen beträgt dies: 1M = +10,7%, 3M = +10,2%, 6M = +8,3% und 9M = +6,1% (Abb. 27 Anhang). Es ist eine leichte Verbesserung der RD durch BoNT-A-Injektion zu erkennen.

S: In dem Areal S beträgt die mittlere RD für die Gruppe K 1923 ± 154 fmol/mg (Abb. 27 Anhang), mit einer erhöhten, nicht signifikanten rechts-links Differenz (+21,3%). Bei der Gruppe LV ist eine Differenz von +19,4% zu verzeichnen (Abb. 19). Für die jeweiligen Altersgruppen betrachtet, ergaben sich folgende Abweichungen: 1M = +15,6% und 3M = +23,5% (Abb. 27 Anhang). Dagegen sinkt die Differenz in der Gruppe LB leicht auf +12,7% (Abb. 19). Das heißt, dass die RD dort um schwache 6,7% gesunken ist. Im einzelnen beträgt dies: 1M = +6,4%, 3M = +10,2%, 6M = +11,1% und 9M = +11% (Abb. 27 Anhang). Es ist eine leichte Verbesserung der RD durch BoNT-A-Injektion zu erkennen, die aber erst nach 6 Monaten eintritt.

DG: Die mittlere RD für das Areal DG beträgt in den Kontrollen 1140 ± 243 fmol/mg (Abb. 27 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (-3%). Die Abweichung der Gruppe LV beträgt dabei geringe +0,3% (Abb. 19). Die Dichtewerte bei längerer Überlebenszeit betrugen: 1M = -0,1% und 3M = +0,4% (Abb. 27 Anhang). In der Gruppe LB hat man im Mittel ebenfalls keine signifikante rechts-links Differenz (+0,5%) (Abb. 19). Hier waren die Dichtewerte in Abhängigkeit des Alters der Ratten: 1M = +1,7%, 3M = -0,9%, 6M = -0,2% und 9M = +1,1% (Abb. 27 Anhang). Nach BoNT-A-Injektion ist hier ein geringer Anstieg über den Ausgangswert zu verzeichnen, der relativ konstant bleibt.

CA1: Für das Hirnareal CA1 beträgt die mittlere RD der Gruppe K 1867 ± 434 fmol/mg (Abb. 27 Anhang). Hier ist keine signifikante rechts-links Differenz zu vermerken (-0,2%). Auch ist keine größere Abweichung in der Gruppe LV festzustellen (+1,9%) (Abb. 19). Nach 1 Monat war der Unterschied bei +2,6% und nach 3 Monaten bei +1,1% (Abb. 27 Anhang). Auch die Differenz nach BoNT-A-Injektion ist im Mittel mit +2,7% nicht signifikant (Abb. 19). Über längere Zeit gesehen, wurden folgende Abweichungen gemessen: 1M = +5,5%, 3M = +1,4%, 6M = +4% und 9M = +1,6% (Abb. 27 Anhang). Es zeigt sich, dass nach BoNT-A-Injektion die RD im Vergleich zum Wert der linken Hemisphäre erhöht ist und über die 9 Monate wieder abgesunken ist. Allgemein ist die RD für den M₂-Rezeptor in der CA1 Region hoch.

3.2.5 M₃-Rezeptor ([³H]-4-Damp)

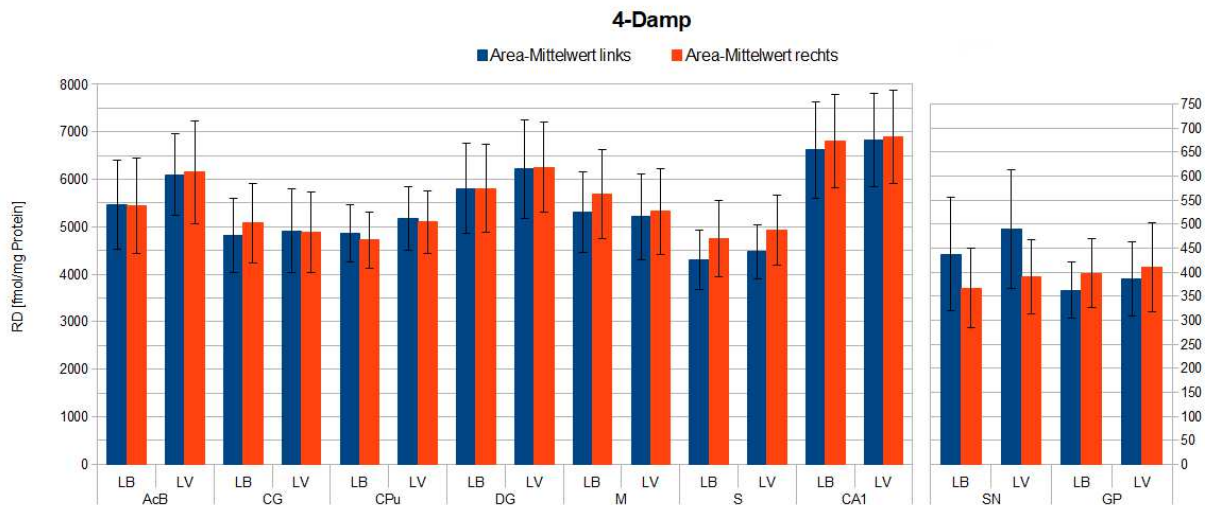


Abbildung 20: Darstellung der mittleren RD für den Ligand [³H]-4-Damp des M₃-Rezeptors

Dargestellt ist die mittlere RD in fmol/mg Protein für die Versuchsgruppen LB (6-OHDA und BoNT-A) und LV (6-OHDA und Vehikellösung) im Vergleich, jeweils für die linke und rechte Hemisphäre, je Hirnareal. Alle Daten stellen den Mittelwert \pm SD dar. Es wurden keine signifikanten Werte mittels post hoc ANOVA ermittelt.

Wie in Abbildung 20 ersichtlich, konnten interhemisphärisch keine signifikanten Werte ermittelt werden. Auch bei einem Vergleich der Werte LV rechts zu LB rechts je Hirnareal wurden keine Signifikanzen gemessen. Im einzelnen ergaben sich folgende Werte:

SN: Im Hirnareal SN liegt die mittlere RD in den Kontrollen bei 325 ± 48 fmol/mg (Abb. 28 Anhang). Auch hier ist keine signifikante rechts-links Differenz zu verzeichnen (+0,9%). In der Gruppe LV beträgt die Abweichung -20,5% (Abb. 20) und ist in Abhängigkeit der Überlebenszeit konstant geblieben: 1M = -20,6% und 3M = -20,4% (Abb. 28 Anhang). Die rechts-links Differenz der Gruppe LB beträgt -16,2% (Abb. 20) und ist somit im Verhältnis zur LV gesunken. Die Dichtewerte bei längerer Überlebenszeit: 1M = -20,5%, 3M = -14,9%, 6M = -17,5% und 9M = -2,8% (Abb. 28 Anhang). Zu Beginn ist eine geringere Wirkung des BoNT-A auf die RD zu verzeichnen, die mit der Überlebenszeit steigt.

GP: Für das Hirnareal GP ist die mittlere RD 623 ± 63 fmol/mg in den Kontrollen (Abb. 28 Anhang). Die rechts-links Differenz beträgt +1% und ist nicht signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV beträgt +6,3% (Abb. 20) und über die Überlebenszeit der Ratten betrachtet, ergaben sich folgende Werte: 1M = +2,9% und 3M = +10,2% (Abb. 28 Anhang). Die Differenz der Gruppe LB beträgt dagegen +9,7% und ist damit höher als bei den LV-Ratten (Abb. 20). In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen in den

Dichtewerten ermittelt: 1M = +14,3%, 3M = +10,2%, 6M = +15,4% und 9M = +16,8% (Abb. 28 Anhang). Es ist festzustellen, dass die RD nach BoNT-A-Injektion gestiegen ist, bei einer allgemein hohen RD im Striatum.

CPu: Die mittlere RD für das Areal CPu beträgt für die Gruppe K 6881 ± 665 fmol/mg (Abb. 28 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (+0,9%). Die Abweichung der Gruppe LV beträgt dabei geringe -1,5% (Abb. 20). Die Dichtewerte nach längerer Überlebenszeit betrugen: 1M = +0,4% und 3M = -3,2% (Abb. 28 Anhang). In der Gruppe LB wurde ebenfalls keine signifikante rechts-links Differenz (-2,9%) festgestellt (Abb. 20). Hier waren die Dichtewerte in Abhängigkeit des Alters der Ratten: 1M = -6%, 3M = -6%, 6M = -1,2% und 9M = -1,8% (Abb. 28 Anhang). Nach BoNT-A-Injektion blieb die RD konstant.

M: Im Hirnareal M liegt die mittlere RD für die Gruppe K bei 6437 ± 1480 fmol/mg (Abb. 28 Anhang). Auch hier ist keine signifikante rechts-links Differenz zu verzeichnen (+4,3%). In der Gruppe LV beträgt die Abweichung +2,2% (Abb. 20) und ist in Abhängigkeit der Überlebenszeit konstant geblieben: 1M = +2,2% und 3M = +2,3% (Abb. 28 Anhang). Die rechts-links Differenz der Gruppe LB beträgt +7% (Abb. 20) und ist somit im Verhältnis zur LV gestiegen. Die Dichtewerte nach längerer Überlebenszeit sind: 1M = +9,8%, 3M = +10,4%, 6M = +11,4% und 9M = +6,1% (Abb. 28 Anhang). Zu Beginn ist eine größere Wirkung des BoNT-A auf die RD zu verzeichnen, die mit der Überlebenszeit sinkt.

AcB: Für das Hirnareal AcB ist die mittlere RD für den M₃-Rezeptor 8015 ± 1104 fmol/mg in den Kontrollen (Abb. 28 Anhang). Die rechts-links Differenz ist +6,8% und damit nicht signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV beträgt +0,9% (Abb. 20) und über die Überlebenszeit der Ratten betrachtet, ergaben sich folgende konstante Werte: 1M = +4,1 % und 3M = -2 % (Abb. 28 Anhang). Die Differenz der Gruppe LB beträgt dagegen -0,1% (Abb. 20). Damit ist die RD höher als bei den LV-Ratten. In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen in den Dichtewerten ermittelt: 1M = -7,4 %, 3M = +1,7 %, 6M = -3,5 % und 9M = +5,1 % (Abb. 28 Anhang). Damit bleiben die Werte nach BoNT-A-Injektion relativ konstant über den Wert der linken Hemisphäre.

CG: Für das Hirnareal CG ist die mittlere RD in den Kontrollen 5117 ± 628 fmol/mg (Abb. 28 Anhang). Die rechts-links Differenz beträgt hier +2,7% und ist damit nicht signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV beträgt -0,7% (Abb. 20) und über die Überlebenszeit der Ratten betrachtet, ergaben sich folgende Werte: 1M = -1,3% und 3M = -0,8% (Abb. 28 Anhang). Die Differenz in der Gruppe LB beträgt dagegen +5,2% (Abb. 20) und ist damit

höher als bei den LV-Ratten. In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen der Dichtewerte ermittelt: 1M = +10,3%, 3M = +9,3%, 6M = +7% und 9M = +6,8% (Abb. 28 Anhang). Die RD bleibt nach BoNT-A-Injektion konstant über den Wert der linken Hemisphäre.

S: Für das Hirnareal S ist die mittlere RD für die Kontrollen 5918 ± 1272 fmol/mg (Abb. 28 Anhang). Die rechts-links Differenz beträgt hier +5,6% und ist damit nicht signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV beträgt +10,2% (Abb. 20) und über die Überlebenszeit der Ratten betrachtet, ergaben sich folgende konstante Werte: 1M = +10,8% und 3M = +9,6% (Abb. 28 Anhang). Die Differenz in der Gruppe LB beträgt +10,3% und ist damit konstant zu dem Wert der LV-Ratten (Abb. 20). In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen in den Dichtewerten ermittelt: 1M = +13,2%, 3M = +8,5%, 6M = +11,4% und 9M = +9% (Abb. 28 Anhang). Damit bleiben die Werte nach BoNT-A-Injektion relativ konstant über den Normalwert links.

DG: In der DG-Region beträgt die mittlere RD für die Gruppe K 7373 ± 1811 fmol/mg (Abb. 28 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (+2,4%). Für die Gruppe LV ist eine Differenz zur 6-OHDA läsionierten Seite von +0,5% zu verzeichnen (Abb. 20). Für die jeweiligen Altersgruppen betrachtet, ergaben sich folgende Abweichungen: 1M = +0,8% und 3M = +0,3% (Abb. 28 Anhang). Dagegen ist die Differenz in der Gruppe LB leicht auf +0,1% gesunken (Abb. 20). Das heißt, dass die RD dort aber um 0,4% gesunken ist. Im einzelnen beträgt dies: 1M = +0,6%, 3M = +1%, 6M = -2,3% und 9M = -0,1% (Abb. 28 Anhang). Es ist eine leichte Verbesserung der RD nach BoNT-A-Injektion über den kontralateralen Wert zu erkennen, die bei längerer Überlebenszeit sinkt.

CA1: Die mittlere RD für das Areal CA1 beträgt 8402 ± 1771 fmol/mg für die Gruppe K (Abb. 28 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (+1,3%). Die Abweichung in der Gruppe LV beträgt dabei geringe +0,9% (Abb. 20). Die Dichtewerte bei längerer Überlebenszeit betrugen: 1M = 0% und 3M = +1,8% (Abb. 28 Anhang). Für die Gruppe LB hat man im Mittel eine stärkere rechts-links Differenz ermittelt als für die Gruppe LV (+2,6%) (Abb. 20). Hier waren die Dichtewerte in Abhängigkeit des Alters der Ratten: 1M = +4,2%, 3M = +6,1%, 6M = +0,2% und 9M = 4,2% (Abb. 28 Anhang). Nach BoNT-A-Injektion ist hier ein leichter Anstieg der RD zu verzeichnen, der konstant bleibt.

3.3. Quantitative Betrachtung der Rezeptordichten für glutamerge Rezeptoren

3.3.1 Kainat-Rezeptor ($[^3\text{H}]$ -Kainat)

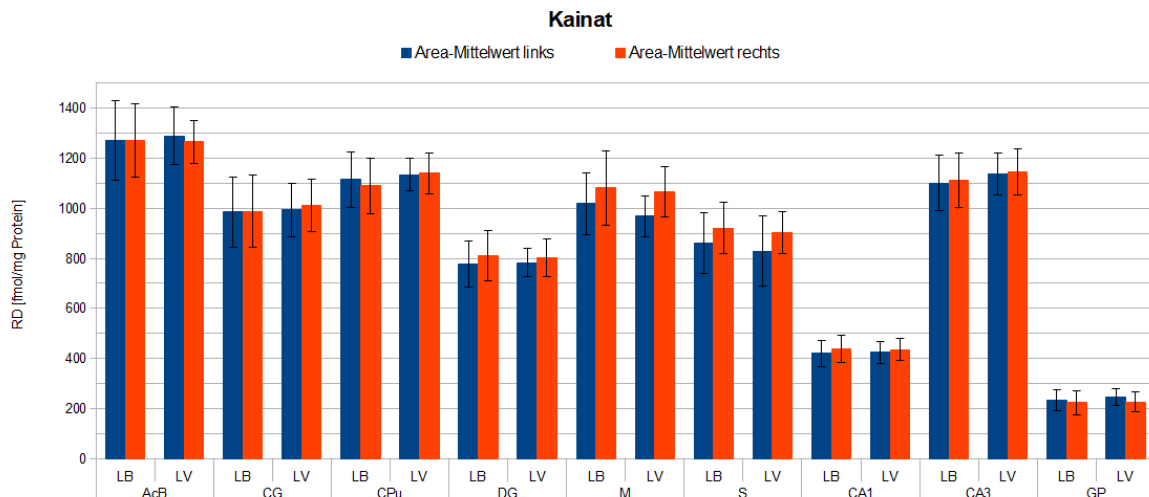


Abbildung 21: Darstellung der mittleren RD für den Agonist $[^3\text{H}]$ -Kainat des Kainat-Rezeptors

Dargestellt ist die mittlere RD in fmol/mg Protein für die Versuchsgruppen LB (6-OHDA und BoNT-A) und LV (6-OHDA und Vehikellösung) im Vergleich, jeweils für die linke und rechte Hemisphäre, je Hirnareal. Alle Daten stellen den Mittelwert \pm SD dar. Es wurden keine signifikanten Werte mittels post hoc ANOVA ermittelt.

Wie in Abbildung 21 ersichtlich, konnten interhemisphärisch keine signifikanten Werte ermittelt werden. Auch bei einem Vergleich der Werte LV rechts zu LB rechts je Hirnareal wurden keine Signifikanzen gemessen. Im einzelnen ergaben sich folgende Ergebnisse:

GP: In der GP-Region beträgt die mittlere RD für die Gruppe K 218 ± 21 fmol/mg (Abb. 29 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (-1,2%). In der Gruppe LV ist eine Differenz zur 6-OHDA läsierten Seite von -7,4% zu verzeichnen (Abb. 21). Für die jeweiligen Altersgruppen betrachtet, ergaben sich folgende Abweichungen: 1M = -13,3% und 3M = +0,7% (Abb. 29 Anhang). Dagegen ist die Differenz in der Gruppe LB auf -4,4% über den linken Wert gesunken (Abb. 21). Das heißt, dass die RD dort gerade um 3% gestiegen ist. Im Einzelnen beträgt dies: 1M = +2,5%, 3M = -6,7%, 6M = -10,4% und 9M = +7,4% (Abb. 29 Anhang). Es ist eine Verbesserung der RD nach BoNT-A-Injektion zu erkennen, die bei längerer Überlebenszeit sinkt. Die RD ist sehr niedrig.

CPu: Für das Hirnareal CPu ist die mittlere RD der Gruppe K 1196 ± 95 fmol/mg (Abb. 29 Anhang). Die rechts-links Differenz beträgt hier 0% und ist damit nicht signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV beträgt +0,6% (Abb. 21) und über die Überlebenszeit

der Ratten betrachtet, ergaben sich folgende konstante Werte: 1M = -2,4% und 3M = +4,3% (Abb. 29 Anhang). Die Differenz der Gruppe LB beträgt dagegen -2,1% (Abb. 21). Die RD hat um 2,7% abgenommen. In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen bei den Dichtewerten ermittelt: 1M = -5,1%, 3M = -4,9%, 6M = -3,6% und 9M = -0,2% (Abb. 29 Anhang). Damit bleiben die Werte nach BoNT-A-Injektion relativ konstant.

M: Im Hirnareal M liegt die mittlere RD bei 1089 ± 91 fmol/mg in den Kontrollen (Abb. 29 Anhang). Auch hier ist keine signifikante rechts-links Differenz zu verzeichnen (+2,7%). In der Gruppe LV beträgt die Abweichung +10,1% (Abb. 21) und ist in Abhängigkeit der Überlebenszeit nur leicht gestiegen: 1M = +5,1% und 3M = +16,6% (Abb. 29 Anhang). Die rechts-links Differenz der Gruppe LB beträgt +6,2% und ist somit im Verhältnis zur Gruppe LV gesunken (Abb. 21). Die Dichtewerte bei längerer Überlebenszeit sind: 1M = -0,6%, 3M = +4,9%, 6M = +6,3% und 9M = +6,9% (Abb. 29 Anhang). Zu Beginn ist eine geringere Wirkung des BoNT-A auf die RD zu verzeichnen, die mit der Überlebenszeit steigt.

AcB: Für die Hirnregion AcB ist die mittlere RD für den Kainat-Rezeptor 1407 ± 162 fmol/mg in den Kontrollen (Abb. 29 Anhang). Die rechts-links Differenz ist +3,1% und damit nicht signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV beträgt -1,9% (Abb. 21) und über die Überlebenszeit der Ratten betrachtet, ergaben sich folgende konstante Werte: 1M = -1% und 3M = -3% (Abb. 29 Anhang). Die Differenz der Gruppe LB beträgt dagegen kaum merkliche -0,1% (Abb. 21). Damit ist die RD höher als bei den LV-Ratten. In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen in den Dichtewerten ermittelt: 1M = -0,8%, 3M = -1%, 6M = +6% und 9M = -0,3% (Abb. 29 Anhang). Damit bleiben die Werte nach BoNT-A-Injektion relativ konstant und haben nach 6 Monate ihren Höhepunkt erreicht.

CG: Für das Hirnareal CG ist die mittlere RD in den Kontrollen 1149 ± 56 fmol/mg (Abb. 29 Anhang). Die rechts-links Differenz beträgt hier -3,2% und ist nicht signifikant. Die Abweichung in der Gruppe LV beträgt +1,9% (Abb. 21) und über die Überlebenszeit betrachtet, ergaben sich folgende Werte: 1M = +1,3% und 3M = +2,6% (Abb. 29 Anhang). Die Differenz der Gruppe LB beträgt dagegen -0,3% und ist damit geringer als in den LV-Ratten (Abb. 21). In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen in den RD ermittelt: 1M = -2,8%, 3M = +1,3%, 6M = +0,8% und 9M = -1,3% (Abb. 29 Anhang). Es ist festzustellen, dass die RD nach BoNT-A-Injektion zunächst sinkt und nach 6 Monaten ihren Höhepunkt erreicht.

S: Die mittlere RD für die Gruppe K für das Areal S beträgt 825 ± 80 fmol/mg (Abb. 29 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (-0,4%). Die Abweichung der Gruppe LV beträgt dabei geringe +4,8% (Abb. 21). Die Dichtewerte nach längerer Überlebenszeit betrugen: 1M = +5,8% und 3M = +12,4% (Abb. 29 Anhang). In der Gruppe LB hat man im Mittel ebenfalls eine kleine rechts-links Differenz ermittelt (+6,9%) (Abb. 21). Die Dichtewerte in Abhängigkeit des Alters der Ratten sind: 1M = +2,4%, 3M = +4,9%, 6M = +9,3% und 9M = +7,8% (Abb. 29 Anhang). Nach BoNT-A-Injektion ist hier ein geringer Anstieg über den Wert der linken Hemisphäre zu verzeichnen, der relativ konstant bleibt.

DG: In dem Areal DG beträgt die mittlere RD in den Kontrollen 781 ± 95 fmol/mg (Abb. 29 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (-5,1%). In der Gruppe LV ist eine schwache Differenz von +2,4% zu verzeichnen (Abb. 21). Für die jeweiligen Altersgruppen ergaben sich folgende Abweichungen: 1M = +4,5% und 3M = +0,2% (Abb. 29 Anhang). Dagegen steigt die Differenz in der Gruppe LB auf +4,2% (Abb. 21). Das heißt, dass die RD dort gerade aber um 1,8% gestiegen ist. Im einzelnen beträgt dies: 1M = +5,4%, 3M = +6,3%, 6M = +5,3% und 9M = +3,6% (Abb. 29 Anhang). Es ist eine leichte Steigerung der RD nach BoNT-A-Injektion über den Wert der linken Hemisphäre zu erkennen. Die allgemeine RD ist im sensorischen Kortex für diesen Rezeptor relativ gering.

CA1: Die mittlere RD für das Areal CA1 Versuchsgruppe K beträgt 446 ± 59 fmol/mg (Abb. 29 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (-3,7%). Die Abweichung der Gruppe LV beträgt dabei geringe +2,8% über den Normalwert (Abb. 21). Die Dichtewerte bei längerer Überlebenszeit betrugen: 1M = +4% und 3M = +1,2% (Abb. 29 Anhang). In der Gruppe LB hat man im Mittel eine höhere rechts-links Differenz ermittelt als in der Gruppe LV (+4%) (Abb. 21). Hier waren die Dichtewerte in Abhängigkeit des Alters der Ratten: 1M = +5,3%, 3M = +7,4%, 6M = +1,9% und 9M = +3,4% (Abb. 29 Anhang). Nach BoNT-A-Injektion ist hier ein leichter Anstieg der RD zu verzeichnen, der mit der Überlebenszeit sinkt. Die RD ist allgemein gering.

CA3: Für das Hirnareal CA3 beträgt die mittlere RD der Gruppe K 1166 ± 109 fmol/mg (Abb. 29 Anhang). Hier ist die rechts-links Differenz -10% und nicht signifikant. Es ist keine größere Abweichung in der Gruppe LV festzustellen (+0,6%) (Abb. 21). Nach 1 Monat war dabei der Unterschied bei +3% und nach 3 Monate bei -2% (Abb. 29 Anhang). Auch die Differenz nach BoNT-A-Injektion ist im Mittel mit +0,9% nicht signifikant (Abb. 21). Über längere Zeit gesehen, wurden folgende Abweichungen gemessen: 1M = +0,1%, 3M = +2,5%,

Ergebnisse

6M = +0,2% und 9M = +1,2% (Abb. 29 Anhang). Es zeigt sich, dass nach BoNT-A-Injektion die RD im Vergleich zur linken Hemisphäre erhöht ist und in Abhängigkeit der Überlebenszeit relativ konstant bleibt.

3.3.2 mGlu 2/3-Rezeptor ($[^3\text{H}]\text{-LY 341/495}$)

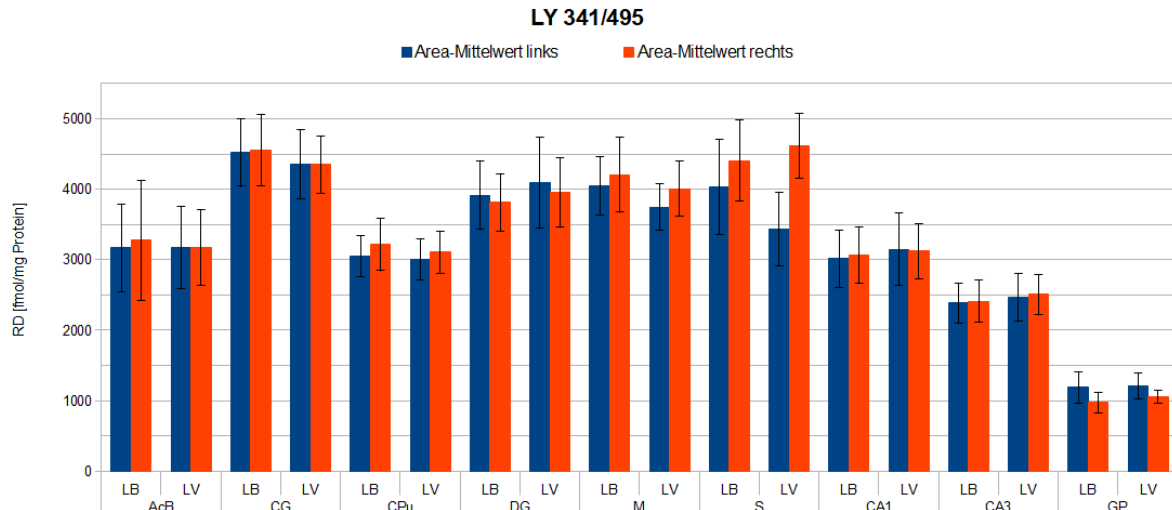


Abbildung 22: Darstellung der mittleren RD für den Ligand $[^3\text{H}]\text{-LY 341/495}$ des mGlu 2/3-Rezeptors

Dargestellt ist die mittlere RD in fmol/mg Protein für die Versuchsgruppen LB (6-OHDA und BoNT-A) und LV (6-OHDA und Vehikellösung) im Vergleich, jeweils für die linke und rechte Hemisphäre, je Hirnareal. Alle Daten stellen den Mittelwert \pm SD dar. Es wurden keine signifikanten Werte mittels post hoc ANOVA ermittelt.

Wie in Abbildung 22 ersichtlich, konnten interhemisphärisch keine signifikanten Werte ermittelt werden. Auch bei einem Vergleich der Werte LV rechts zu LB rechts je Hirnareal wurden keine Signifikanzen gemessen. Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse ermittelt:

GP: Für das Hirnareal GP ist die mittlere RD für die Gruppe K 1411 ± 285 fmol/mg (Abb. 30 Anhang). Die rechts-links Differenz beträgt hier +8,8% und ist damit nicht signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV beträgt -12,9% (Abb. 22) und über die Überlebenszeit der Ratten betrachtet, ergaben sich folgende Werte: 1M = -16,2% und 3M = -8,9% (Abb. 30 Anhang). Die Differenz der Gruppe LB beträgt dagegen -17,7% und ist damit höher als bei den LV-Ratten (Abb. 22). In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen bei den Dichtewerten ermittelt: 1M = -19%, 3M = -15,5%, 6M = -21,1% und 9M = -23,9% (Abb. 30 Anhang). Hier ist festzustellen, dass die RD nach BoNT-A-Injektion sinkt, betrachtet bei vergleichsweise kleinen Dichte-Werten.

CPu: Im Hirnareal CPu liegt die mittlere RD in den Kontrollen bei 3400 ± 517 fmol/mg (Abb. 30 Anhang). Auch hier ist keine signifikante rechts-links Differenz zu verzeichnen (+0,9%). In der Gruppe LV beträgt die Abweichung +3,3% (Abb. 22) und ist in Abhängigkeit der Überlebenszeit nur leicht gestiegen: 1M = +1,2% und 3M = +5,2% (Abb. 30 Anhang). Die rechts-links Differenz der Gruppe LB beträgt +5,3% (Abb. 22) und somit ist die RD um leichte 1,9% gestiegen. Die Dichtewerte nach längerer Überlebenszeit: 1M = +3,5%, 3M = +6,1%, 6M = +6,7% und 9M = +8,4% (Abb. 30 Anhang). Zu Beginn ist eine kleinere Wirkung des BoNT-A auf die RD zu verzeichnen, die mit der Überlebenszeit leicht zunimmt.

M: Für das Hirnareal M ist die mittlere RD in den Kontrollen 4984 ± 600 fmol/mg (Abb. 30 Anhang). Die rechts-links Differenz beträgt hier +5,5% und ist damit nicht signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV beträgt +7% (Abb. 22) und über die Überlebenszeit der Ratten betrachtet, ergaben sich folgende konstante Werte: 1M = +12,5% und 3M = +1,5% (Abb. 30 Anhang). Die Differenz der Gruppe LB beträgt dagegen +3,9% und ist damit zwar geringer als bei den LV-Ratten, allerdings hat die RD um 1,6% abgenommen (Abb. 22). In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen bei den Dichtewerten ermittelt: 1M = +0,5%, 3M = +2,8%, 6M = +3,2% und 9M = +3,6% (Abb. 30 Anhang). Damit bleiben die Werte nach BoNT-A-Injektion relativ konstant über den kontralateralen Wert.

AcB: Die mittlere RD pro Fläche für die mGlu2/3-Rezeptoren im AcB der Versuchsgruppe K liegt bei 3329 ± 567 fmol/mg (Abb. 30 Anhang), dabei wurden keine signifikanten rechts-links Differenzen festgestellt (+5,7%). Zwischen rechter und linker Hemisphäre wurde für die Gruppe LV keine Abweichung festgestellt (Abb. 22). Die Dichtewerte bei längerer Überlebenszeit blieben konstant bei: 1M = +4,9% und 3M = -4,2% (Abb. 30 Anhang). Die Differenz zwischen rechter und linker Hemisphäre bei LB-Ratten ist mit +3,3% größer als bei den LV-Ratten (Abb. 22). Das heißt, dass die RD nach BoNT-A-Injektion um 3,3% gestiegen ist im Vergleich zu den LV-Ratten. Auch hier sieht man Veränderungen der RD bei längerer Überlebenszeit: 1M = -0,3%, 3M = +6,4%, 6M = +3,4% und 9M = +9,4% (Abb. 30 Anhang). Resultierend ist eine Steigerung der RD nach BoNT-A-Injektion zu verzeichnen. Die Vehikel-Injektion beeinflusst die RD nicht.

CG: In der CG-Region beträgt die mittlere RD für die Gruppe K 4310 ± 388 fmol/mg (Abb. 30 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (+0,2%). Für die Gruppe LV ist keine Differenz zur 6-OHDA läsionierten Seite zu verzeichnen (Abb. 22). Für die jeweiligen Altersgruppen ergaben sich folgende Abweichungen: 1M = -0,6% und 3M = +0,6% (Abb. 30

Anhang). Dagegen steigt die Differenz in der Gruppe LB leicht auf +0,8% (Abb. 22). Das heißt, dass die RD dort gerade um 0,8% gestiegen ist. Im einzelnen beträgt dies: 1M = +0,6%, 3M = -0,4%, 6M = +1,6% und 9M = +2,9% (Abb. 30 Anhang). Es ist eine leichte Verbesserung der RD nach BoNT-A-Injektion zu erkennen.

S: In dem S Areal beträgt die mittlere RD für die Gruppe K 5246 ± 773 fmol/mg (Abb. 30 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (+1,7%). Für die Gruppe LV ist eine Differenz von +34,4% zu verzeichnen (Abb. 22). Für die jeweiligen Altersgruppen ergaben sich folgende konstante Abweichungen: 1M = +20,5% und 3M = +51,7% (Abb. 30 Anhang). Dagegen sinkt die Differenz in der Gruppe LB auf +9,3% (Abb. 22). Das heißt, dass die RD dort um 25,1% gesunken ist. Im einzelnen beträgt dies: 1M = -3,9%, 3M = -2,8%, 6M = +3,4% und 9M = -0,1% (Abb. 30 Anhang). Es ist eine leichte Steigerung der RD nach BoNT-A-Injektion zu erkennen.

DG: Die mittlere RD für das Areal DG beträgt 4207 ± 574 fmol/mg in den Kontrollen (Abb. 30 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (+4,5%). Die Abweichung der Gruppe LV beträgt geringe -3,2% (Abb. 22). Die Dichtewerte bei längerer Überlebenszeit betrugen: 1M = -2,3% und 3M = -4,2% (Abb. 30 Anhang). In der Gruppe LB hat man im Mittel eine geringere rechts-links Differenz ermittelt als bei LV (-2,6%) (Abb. 22). Hier war die RD in Abhängigkeit des Alters der Ratten: 1M = -0,2%, 3M = -4,7%, 6M = -0,7% und 9M = -3,4% (Abb. 30 Anhang). Nach BoNT-A-Injektion ist ein leichter Anstieg der RD und damit eine Verringerung der Differenz zu verzeichnen.

CA1: Für das Hirnareal CA1 beträgt die mittlere RD der Gruppe K 3631 ± 425 fmol/mg (Abb. 30 Anhang). Hier ist die rechts-links Differenz -0,8% und damit nicht signifikant. Es ist keine größere Abweichung bei der Gruppe LV festzustellen (-0,8%) (Abb. 22). Nach 1 Monat war dabei der Unterschied bei -0,3% und nach 3 Monate bei -1,3% (Abb. 30 Anhang). Auch die Differenz nach BoNT-A-Injektion ist im Mittel mit +1,7% nicht signifikant (Abb. 22). Über längere Zeit gesehen, wurden folgende Abweichungen gemessen: 1M = +7%, 3M = +3,9%, 6M = +0,3% und 9M = +1,8% (Abb. 30 Anhang). Es zeigt sich, dass nach BoNT-A-Injektion die RD im Vergleich zur linken Hemisphäre erhöht ist und in Abhängigkeit der Überlebenszeit sinkt. Für diesen Liganden ist die RD des mGlu 2/3-Rezeptors sehr hoch.

CA3: In der CA3-Region beträgt die mittlere RD für die Gruppe K 2809 ± 451 fmol/mg (Abb. 30 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (+1,9%). In der Gruppe LV ist eine Differenz zur 6-OHDA läsierten Seite von +1,9% zu verzeichnen (Abb. 22). Für

Ergebnisse

die jeweiligen Altersgruppen ergaben sich folgende Abweichungen: 1M = +1,6% und 3M = +2,2% (Abb. 30 Anhang). Dagegen ist Differenz in der Gruppe LB ähnlich mit +1% (Abb. 22). Das heißt, dass die RD im Vergleich zur LV Gruppe konstant blieb. Im einzelnen beträgt dies: 1M = +2,8%, 3M = -0,5%, 6M = +0,6% und 9M = -0,5% (Abb. 30 Anhang). Es ist eine leichte Verbesserung der RD nach BoNT-A-Injektion zu erkennen.

3.3.3 NMDA-Rezeptor ($[^3\text{H}]$ -MK-801)

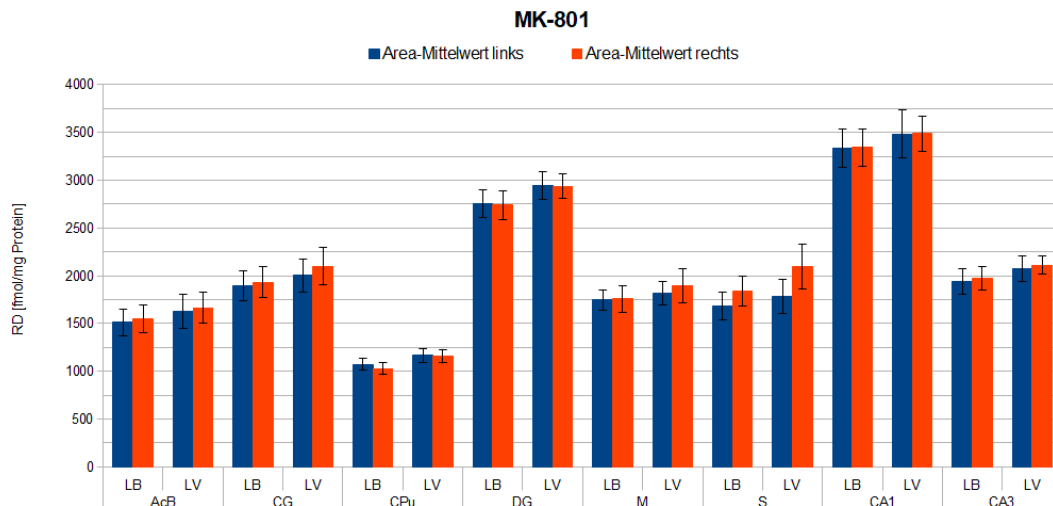


Abbildung 23: Darstellung der mittlere RD für den Ligand $[^3\text{H}]$ -MK-801 des NMDA-Rezeptors

Dargestellt ist die mittlere RD in fmol/mg Protein für die Versuchsgruppen LB (6-OHDA und BoNT-A) und LV (6-OHDA und Vehikellösung) im Vergleich, jeweils für die linke und rechte Hemisphäre, je Hirnareal. Alle Daten stellen den Mittelwert \pm SD dar. Es wurden keine signifikanten Werte mittels post hoc ANOVA ermittelt.

Wie in Abbildung 23 ersichtlich, konnten interhemisphärisch keine signifikanten Werte ermittelt werden. Auch bei einem Vergleich der Werte LV rechts zu LB rechts je Hirnareal wurden keine Signifikanzen gemessen. Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse ermittelt:

CPu: Die mittlere RD für das Areal CPu beträgt in den Kontrollen 1190 ± 66 fmol/mg (Abb. 31 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (+0,7%). Die Abweichung der Gruppe LV beträgt dabei geringe -0,8% (Abb. 23). Die Dichtewerte bei längerer Überlebenszeit betrugen: 1M = -0,2% und 3M = -1,4% (Abb. 31 Anhang). In der Gruppe LB wurde keine signifikante rechts-links Differenz (-4,2%) gefunden (Abb. 23). Hier waren die Dichtewerte in Abhängigkeit des Alters der Ratten: 1M = -7%, 3M = -7,3%, 6M = -9,8% und 9M = -0,9% (Abb. 31 Anhang). Nach BoNT-A-Injektion ist hier ein geringer Anstieg der RD zu verzeichnen, der mit der Überlebenszeit sinkt.

M: Im Hirnareal M liegt die mittlere RD der Kontrollen bei 1925 ± 161 fmol/mg (Abb. 31 Anhang). Auch hier ist keine signifikante rechts-links Differenz zu verzeichnen (+3,7%). In der Gruppe LV beträgt die Abweichung +4,6% (Abb. 23) und ist in Abhängigkeit der Überlebenszeit nur leicht gestiegen: 1M = +4,3% und 3M = +5% (Abb. 31 Anhang). Die rechts-links Differenz der Gruppe LB beträgt +0,7% und ist somit im Verhältnis zur Gruppe LV gesunken (Abb. 23). Die Dichtewerte nach längerer Überlebenszeit sind: 1M = -5%, 3M = +0,6%, 6M = -3,6% und 9M = +2,1% (Abb. 31 Anhang). Zu Beginn ist eine geringere Wirkung des BoNT-A auf die RD zu verzeichnen, die mit der Überlebenszeit sinkt.

AcB: Für das Hirnareal AcB ist die mittlere RD für den M_1 -Rezeptor der Gruppe K 1581 ± 93 fmol/mg (Abb. 31 Anhang). Die rechts-links Differenz beträgt hier +2% und ist damit nicht signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV beträgt +2,3% (Abb. 23) und über die Überlebenszeit der Ratten betrachtet, ergaben sich folgende konstante Werte: 1M = +2,8% und 3M = +1,8% (Abb. 31 Anhang). Die Differenz der Gruppe LB beträgt +2,2% (Abb. 23). Damit ist die RD identisch der RD der LV-Ratten. In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen in den Dichtewerten ermittelt: 1M = +0,1%, 3M = +1,8%, 6M = -1,8% und 9M = +8,7% (Abb. 31 Anhang). Damit bleiben die Werte nach BoNT-A-Injektion relativ konstant und steigen bis über den Wert der linken Hemisphäre nach 9 Monate.

CG: Für das Hirnareal CG ist die mittlere RD 1943 ± 125 fmol/mg für die Gruppe K (Abb. 31 Anhang). Die rechts-links Differenz beträgt hier -2,6% und ist damit nicht signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV beträgt +4,8% (Abb. 23) und über die Überlebenszeit der Ratten betrachtet, ergaben sich folgende Werte: 1M = +2,4% und 3M = +1,2% (Abb. 31 Anhang). Die Differenz der Gruppe LB beträgt dagegen +1,9% und ist damit geringer als bei den LV-Ratten (Abb. 23). In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen in den Dichtewerten ermittelt: 1M = -0,6%, 3M = -1%, 6M = -0,9% und 9M = +3,8% (Abb. 31 Anhang). Hier ist festzustellen, dass die RD nach BoNT-A-Injektion sinkt.

S: Für das Hirnareal S ist die mittlere RD 1724 ± 136 fmol/mg für die Gruppe K (Abb. 31 Anhang). Die rechts-links Differenz beträgt hier +5,5% und ist damit nicht signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV beträgt +17,5% (Abb. 23) und über die Überlebenszeit der Ratten betrachtet, ergaben sich folgende konstante Werte: 1M = +12,8% und 3M = +22,9% (Abb. 31 Anhang). Die Differenz der Gruppe LB beträgt dagegen +9,4% und ist damit geringer als bei den LV-Ratten (Abb. 23). Die RD hat um 8,1% abgenommen. In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen in den Dichtewerten ermittelt:

1M = +4,5%, 3M = +3,7%, 6M = +4,5% und 9M = +7,3% (Abb. 31 Anhang). Damit bleiben die Werte nach BoNT-A-Injektion relativ konstant über den Wert der linken Hemisphäre.

DG: Für das Hirnareal DG ist die mittlere RD für Gruppe K 2773 ± 107 fmol/mg (Abb. 31 Anhang). Die rechts-links Differenz beträgt +0,9% und ist damit nicht signifikant. Die Abweichung in der Versuchsgruppe LV beträgt -0,3% (Abb. 23) und über die Überlebenszeit der Ratten betrachtet, ergaben sich folgende konstante Werte: 1M und 3M = -0,3% (Abb. 31 Anhang). Die Differenz der Gruppe LB beträgt dagegen -0,4% (Abb. 23) und ist damit fast identisch den LV-Ratten. In Abhängigkeit des Alters wurden folgende Abweichungen in den Dichtewerten ermittelt: 1M = -3,2%, 3M = +0,4%, 6M = -0,7% und 9M = +1,4% (Abb. 31 Anhang). Damit bleiben die Werte nach BoNT-A-Injektion relativ konstant.

CA1: Für das Hirnareal CA1 beträgt die mittlere RD der Gruppe K 3208 ± 137 fmol/mg (Abb. 31 Anhang). Hier ist die rechts-links Differenz +0,8%, was nicht signifikant ist. Es ist keine größere Abweichung für die Gruppe LV festzustellen (+0,1%) (Abb. 23). Nach 1 Monat war dabei der Unterschied 0% und nach 3 Monate +0,2% (Abb. 31 Anhang). Auch die Differenz nach BoNT-A-Injektion ist im Mittel mit +0,1% nicht signifikant (Abb. 23). Nach längerer Überlebenszeit wurden folgende Abweichungen gemessen: 1M = -0,9%, 3M = +0,3%, 6M = -0,3% und 9M = +1,5% (Abb. 31 Anhang). Es zeigt sich das nach BoNT-A-Injektion die RD im Vergleich zur linken Hemisphäre teils über diesen Wert erhöht ist.

CA3: Die mittlere RD für das Areal CA3 beträgt 1869 ± 92 fmol/mg in den Kontrollen (Abb. 31 Anhang), bei keiner signifikanten rechts-links Differenz (+2,6%). Die Abweichung der Gruppe LV beträgt dabei +1,8% (Abb. 23). Die Dichtewerte nach längerer Überlebenszeit waren: 1M = +2,4% und 3M = +1,2% (Abb. 31 Anhang). Für die Gruppe LB hat man im Mittel eine geringere rechts-links Differenz ermittelt als für die Gruppe LV (+1,9%) (Abb. 23). Hier waren die Dichtewerte in Abhängigkeit des Alters der Ratten: 1M = +0,5%, 3M = +3,9%, 6M = +0,2% und 9M = +2,7% (Abb. 31 Anhang). Nach BoNT-A-Injektion ist hier ein leichter Anstieg der RD zu verzeichnen, der mit der Überlebenszeit wieder sinkt.

4. Diskussion

4.1 Beurteilung des Nutzens des Tiermodells

Grundlage dieser Arbeit ist das Hemiparkinson-Modell der Ratte. Das hier verwendete Neurotoxin-basierte Modell ist eines von mehreren möglichen Tiermodellen, wobei keines es schafft die Krankheit, dessen Pathologie und Symptome vollständig wiederzugeben. Jedes Modell basiert darauf, einen oder mehrere wesentliche Prozesse der Erkrankung darzustellen. Bei dem 6-OHDA-Modell beruht dies maßgeblich auf der Zerstörung dopaminerger Neurone im nigrostriatalen Trakt durch Apoptose (Gubellini and Kachidian, 2015; Hernandez-Baltazar et al., 2017). Somit hat dieses Modell seine Vorteile und auch Grenzen, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen. Vorteile der Neurotoxin-basierten Modelle sind dabei: 1. Verschiedene Stadien des MP können im Seitenvergleich, in Abhängigkeit der injizierten Dosis 6-OHDA, dargestellt werden. Weiterhin liegen auch nicht therapierte Vergleichstiere vor. 2. Auch die Veränderung in den RD können gezeigt werden. Somit könnte eine signifikante Erhöhung der glutamergen Übertragung in Basalganglien bei massiver 6-OHDA-Injektion nachgewiesen werden (Schwartz and Huston, 1996a). 3. Nicht zuletzt wird es zur Wirkungsforschung möglicher Parkinsontherapien verwendet: L-Dopa, Tiefenhirnstimulation, "targeting" von metabotropen Glutamat-Rezeptoren (Amalric, 2015) sowie dem von uns verwendeten BoNT-A (Mehlan et al., 2016). Grenzen des Modells sind besonders im Bezug auf MP das Fehlen der Lewy-Körperchen und vor allem die Progressivität. Mit der Progressivität wird ausgedrückt, dass Neurotoxin-induzierte Modelle zur Forschung des MP zwar offensichtliche Regionen wie die SNpc und das Striatum (= nigrostriataler Trakt) berücksichtigen, jedoch andere neuronale Systeme des Rattenhirn nicht (VTA, rostrale Region, primär motorische und somatosensorische Kortex sowie nicht dopaminerge Neurone der SNpc). Grund dafür ist die begrenzte Fähigkeit des 6-OHDA im Gehirn nur dopaminerge und noradrenerge Neurone zu degenerieren (Ungerstedt, 1968). Diese Arten von Neurone sind besonders anfällig für 6-OHDA, da ihre Plasmamembrantransporter, die dopaminergen- bzw. noradrenergen Transporter, eine hohe Affinität für dieses Molekül aufweisen (Luthman et al., 1989). Dementsprechend ist die nigrostriatale Region sehr empfindlich gegenüber dem Neurotoxin. Um auf spezifische Neurone zu zielen und die Blut-Hirn-Schranke zu umgehen, wird 6-OHDA deshalb stereotaktisch injiziert. Areale wie SN und auch das VTA können in Tiermodellen, die z.B. den irreversiblen Ubiquitin-Proteasom-Inhibitor Laktacystin verwenden, erforscht werden

(Harrison et al., 2016; Luk et al., 2012; Pienaar et al., 2015). Die Ausbreitung der α Syn-Pathologie im Gehirn und die Nähe des SNpc zum VTA weist darauf hin, dass diese Regionen ebenfalls von MP betroffen ist, somit sind VTA-Neuronenzahlen in MP-Gehirnen im Vergleich zur Kontrolle reduziert, was aber mit dem hier verwendeten Modell nicht nachgewiesen werden kann (Rinne et al., 1990). Gleiches gilt auch für den Zusammenhang zwischen Ach (-Rezeptoren) im frontalen Kortex und dem Läsionsbereich im Nucleus basalis Meynert (cholinerges Signalweg für Aufmerksamkeit und Gedächtnis; Kern mit höchster Konzentration nAch-Rezeptoren), dessen Ausfall bei MP eine wesentliche Rolle spielt (Ach-Mangel). Der Kern wird durch 6-OHDA-Läsion nicht erreicht, sodass es zu keinem direkten Eingriff in das cholinerge System kommt (nur indirekt über Dopamin). Andere Forscher verwenden z.B. Ibotensäure zur bilateralen Läsion der Substantia innominata, einschließlich des Nucleus basalis Meynert bei Ratten, um genau diesen Effekt dort beurteilen zu können (Kato et al., 1999).

Vergleiche in Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass der Aufbau und die Physiologie des Rattengehirns dem des Menschen bereits in den Entwicklungsphasen ähnelt. Auch wenn Größe, Form und Aufbau verschieden sind, haben sie ähnliche Hirnregionen, Nervenbahnen und dieselben Neurotransmitter mit entsprechenden Rezeptoren (Bayer et al., 1993).

Somit kann hier abschließend gesagt werden, dass in unserem Modell der Hemiparkinson-Ratte eine isolierte Läsion der SNpc dargestellt wird, die mit den nötigen Abstrichen auch auf dem Menschen übertragen werden könnte. So ist es möglich, die isolierten Auswirkungen des Dopamin-Mangels auf die SN sowie eine gezielte Beschreibung der Veränderung der RD in den unterschiedlichen Hirnarealen bezogen auf eine mögliche Ursache zu zeigen. Effekte auf andere neuronale Systeme werden nicht untersucht und sollten Bestandteil weiterer Forschungen sein.

4.2 Rezeptordichten der LV Ratten für acetylcholinerge Rezeptoren

nAch-Rezeptor

Vergleicht man die im Rahmen der Promotionsarbeit ermittelten RD des nAch-Rezeptor mit bisherigen Angaben aus der Literatur, ist festzustellen, dass dieser im Rattenhirn generell eine sehr kleine mittlere RD hat, mit Ausnahme des medialen Habenularkerns (MHB). Dies betrifft unbehandelte, wie auch therapierte oder scheintherapierte Ratten. Die hohe Dichte des nAch-Rezeptors speziell in dem Kern wurde bereits in anderen Forschungen mittels Autoradiographie nachgewiesen, während z.B. die M-Rezeptoren dort nicht vertreten sind

(Martin and Aceto, 1981; McCormick and Prince, 1987; Rotter et al., 1979). Für die Höhe der RD z.B. im CPU gibt es unterschiedliche Ergebnisse. So fanden Haghiri et al. eine RD von 125 fmol/mg, Bauer et al. eine RD von 457 fmol/mg, Cremer et al. eine RD von 558 fmol/mg und Palomero-Gallagher et al. nur eine RD von 94 fmol/mg, im Vergleich zu unserer RD für die Kontrolltiere von 387 fmol/mg (Bauer et al., 2005; Cremer et al., 2015; Haghiri et al., 2009; Palomero-Gallagher et al., 2008). Die RD für andere Areale im Vergleich zu publizierten Literaturen sind in Tabelle 4 (Anhang) zusammengetragen. So ist festzustellen, dass die in dieser Arbeit erhaltenen Werte weitgehend mit den Kontrollwerten von Bauer et al. übereinstimmen, während Palomero-Gallagher et al. wesentlich niedrigere RD erzielte. Gründe für die Differenzen in den gemittelten RD können unterschiedliche Ansätze in der Versuchsplanung und -durchführung der jeweiligen Autoren sein. So wurden beispielsweise bei den in Tabelle 4 (Anhang) aufgeführten Arbeiten bereits verschiedene Versuchstiere, u.a. Wistar-Ratten (Haghiri et al., 2009), Sprague-Dawley-Ratten (Bauer et al., 2005), Long-Evans-Ratten (Palomero-Gallagher et al., 2008) und Pitxak Mäuse (Cremer et al., 2015) verwendet. Für unsere Rezeptor-Bindungsstudie kamen männliche Wistar-Ratten zum Einsatz.

Bisherige Forschungen, welche die striatalen Veränderungen des MP am Menschen post mortem analysierten, ergaben recht widersprüchliche Ergebnisse. So beschreiben u.a. Aubert et al. unter Verwendung der *in vitro*-Rezeptor-Autoradiographie (mit dem selektiven Radioliganden [³H]-Methylcarbamylcholin) eine Verringerung der RD um 74% im Striatum, von 65% im temporalen Kortex, von 39% im Hippocampus und von 55% im frontalen Kortex (Aubert et al., 1992) von Patienten mit Morbus Parkinson. Meyer et al. fanden mittels PET-Analyse mit 2-[¹⁸F] FA-85380 (Radiotracer mit hoher Affinität zum nACh-Rezeptor) eine Reduktion von 20% im CPU, von ~30% im Nucleus caudatus, zwischen 20-40% im CG, von 30% im Frontal-, 50% im Parietal-, 30% im Temporallappen und von ~20% im Hippocampus (Meyer et al., 2009). Auch Durany et al. erforschten eine Abnahme der striatalen RD im Menschen um 25%, die sie aber als nicht signifikant beschrieben (Durany et al., 2000). Andere Ergebnisse fanden Lang et al., die Veränderungen mittels *in-vitro*-Rezeptorbindungsstudien analysierten, aber keine Veränderungen der Cholin-Acetyltransferase-Aktivität im CPU im post mortem Material fanden (Lange et al., 1993). Die maximale [³H]-Nikotinbindung war dabei im Kortex und Hippocampus reduziert. Kas et al. fanden *in vivo* mit PET, entsprechend Meyer et al., auch mit 2-[¹⁸F] Fluor-A-85380 eine Abnahme im Striatum (10%) und SN (14,9%) von MP-Patienten (Kas et al., 2009). Somit

zeigen viele post mortem Studien am Menschen eine allgemeine Abnahme der Dichte der zerebralen nAch-Rezeptoren bei MP.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde eine signifikante Abnahme der RD in der Gruppe LV von über 50% im AcB gemessen, die über die hier bestimmte Überlebenszeit konstant blieb. Auch im CPu wurde eine signifikante konstante Reduktion über 55% gemessen. In den übrigen Hirnarealen wurde ebenfalls eine Verringerung der RD festgestellt (u.a. CG = 16%, M = 12%), diese waren aber nicht signifikant.

Vergleicht man diese Werte mit denen aus der Literatur, so finden sich hier Gemeinsamkeiten wie auch Unterschiede in den Werten. So wird im CPu von MPTP behandelten Totenkopffaffen mit den Liganden [^3H]-Epibatidin beobachtet, dass die nAch-RD ebenfalls um 40% bis 50% bei mäßiger Läsionierung und um 55-60% bei starker Läsionierung des Striatums zurückging (Kulak et al., 2002), was auch den Werten dieser Arbeit entspricht. Zoli et al. stellten ebenfalls eine Abnahme von 50% der RD 2 Wochen nach 6-OHDA-Läsion in MVB von Ratten mit dem Liganden [^3H]-Epibatidin im Striatum fest (Zoli et al., 2002). Clarke & Pert konnten mit einer unilateralen Injektion von 6-OHDA in das MVB von männlichen Wistar-Ratten autoradiographisch eine Reduktion der [^3H]-Nikotin-Bindung im Striatum von 25-33% und im AcB um ~40% feststellen (Clarke and Pert, 1985). Studien von Paterson und Nordberg ergaben, dass die Ligandenspezifität für den nAch-Rezeptor für [^3H]-Nikotin ähnlich der des Liganden [^3H]-Epibatidin (beides sind Agonisten) ist, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den beiden Liganden ermöglicht (Paterson and Nordberg, 2000). Perez et al. beobachteten eine Abnahme von 47% im ipsilateralen Striatum nach unilateraler Injektion des Neurotoxins in das MVB von Ratten mit spezifischer Ligandenbindung durch [^3H]-Epibatidin (Perez et al., 2010). Pradhan et al. berichteten von einem Rückgang von etwa 36% im Striatum und 25% im AcB mit [^{125}I]-Epibatidin-Bindung 3 Wochen nach Injektion des 6-OHDA. Sie beobachteten auch, dass die Vehikel-Injektion keine Änderungen in der nAch-RD im CPu verursachte (Pradhan et al., 2002). Schwartz et. al. zeigten mittels einer intraventrikulären Injektion von 6-OHDA mittels Rezeptorautoradiographie eine signifikante Abnahme von 29% im läsionierten Striatum mit Bindung des Liganden [^3H]-Acetylcholin. Auch im Hypothalamus der Ratten wurde von ihnen eine Verringerung der RD verzeichnet (Schwartz et al., 1984). Dieser Wert entspricht rund die Hälfte des RD-Wertes, der im Rahmen dieser Arbeit gemessen wurde. Grund dafür kann der verwendete Ligand sein sowie der Ort der Injektion des 6-OHDA. Das von uns gefundene Ergebnis bei Hemiparkinson-Ratten entspricht weitgehend den Befunden der

Pitx3ak Maus, wo die striatale nAch-RD ebenfalls massiv reduziert war (47% im Vergleich zu Kontrolltieren). Widersprüchlich wurde aber im M und S eine leichte Steigerung von ~3% beobachtet. In der Region CA1 sank die RD um 9% und im DG um 16% (Cremer et al., 2015). Härfstrand et al. fanden nach 6-OHDA Läsion mittels [³H]-Nikotin Differenzen von -30% im AcB und im CPu sowie eine Verringerung von 40% im VTA und SNpc (Übersicht der Forschungsergebnisse in Tabelle 6 Anhang) (Härfstrand et al., 1987).

Alle o.g. Autoren untersuchen die Rattenhirne zwischen 1-5 Wochen nach Läsionierung durch 6-OHDA. In der vorliegenden Arbeit wird der Läsionseffekt über 3 Monate (LV) nach Läsionierung beobachtet. Dabei wurden in einigen Arealen Reduktionen von bis zu 55% im Vergleich zu den Kontrollratten erzielt. Diese Ergebnisse (für AcB und CPu) blieben über den gesamten Untersuchungszeitraum Abb. 24 (Anhang) für die Gruppe LV, nahezu konstant, was über die Länge des Beobachtungszeitraumes dafür spricht, dass es zu einer dauerhaften und irreversiblen Verminderung der nAch-RD durch das Neurotoxin kam. Auch in den anderen Hirnarealen wurden keine Schwankungen der RD über den Untersuchungszeitraum ermittelt, was auch hier für eine leichtere irreversible Reduktion der RD spricht. Somit lässt sich, wie bereits von einigen Autoren (Schwartz et al.) beschrieben, auch kein Einfluss der Injektion der Vehikellösung (bzw. der stereotaktischen Operation) auf die RD aller Hirnareale finden (LV). Aus diesem Grund kann man darauf schließen, dass die operative Injektion eines Wirkstoffes kaum bis keine Auswirkungen auf die RD hat. Dabei muss hier aber darauf hingewiesen werden, dass für die Gruppe LV nur Daten in einem Zeitraum bis 3 Monate nach Vehikel-Injektion vorliegen. Dies ist den limitierten Ressourcen dieser umfangreichen Untersuchungsreihe geschuldet. Da weiterhin ausschließlich ipsilateral zur Läsion eine signifikante Reduktion in den RD gemessen wurde, ist ein auf die kontralaterale Hemisphäre übergreifender Effekt des 6-OHDA unwahrscheinlich.

Erklärt werden kann der massive Verlust der nAch-Rezeptoren nach Zerstörung dopaminerge SNpc-Neuronen durch eine vorherrschende Lokalisation von nAch-Rezeptoren auf nigrostriatalen dopaminergen Axon-Terminalen, die nach 6-OHDA-Läsion vermindert sind (Jones et al., 2001; Kaiser and Wonnacott, 2000; Pradhan et al., 2002). Zudem sind rund 50% der striatalen nAch-Rezeptoren an kortikalen Afferenzen oder den striatalen Interneuronen lokalisiert (Zoli et al., 2002). Damit erklärten Zoli et al., woher die verbliebende striatale [³H]-Epibatidin Bindung nach 6-OHDA-Läsion kommt, da es nAch-Rezeptor-Untereinheiten gibt, die spezifisch an dopaminerge Terminale exprimiert sind, ebenso wie solche, die auch an

nicht-dopaminergen Terminalen lokalisiert sind und somit nicht von der 6-OHDA-Läsion betroffen sind. Zur Unterscheidung der Subtypen die durch dopaminerge und nicht-dopaminerge Strukturen exprimiert werden, führten Zoli et al. eine striatale Dopamin-Denervierung unter Verwendung von 6-OHDA durch. Diese Technik erlaubte eine selektive Zerstörung von Dopamin-Terminalen. Das Ausmaß der Denervierung betrug 50%, welche den Rest an möglichen Bindungen durch [³H]-Epibatidin an nicht dopaminergen Strukturen entspricht (Zoli et al., 2002). Auch in unseren Ergebnissen wurde nach 6-OHDA-Läsion (Gruppe LV, Abb. 9) eine rund 50%ige Reduktion der RD mit diesem Liganden im CPu und AcB festgestellt. Simultan ließe sich das auch für die übrigen Hirnareale darstellen, für die nach aktueller Kenntnis kaum Vergleichswerte vorliegen. Zudem fanden abschließend Zolles et al. den endgültigen Nachweis für die weitere Lokalisation des Rezeptors auf Pyramidenzellen der Schicht 5 des Neocortex (Zolles et al., 2009).

Weiterhin wäre zu klären, wie durch den nACh-Rezeptor die nigrostriatale Dopaminfunktion moduliert werden kann. Verschiedene Autoren gaben an, dass die Dopamin-Neurotransmission durch tonisch aktive cholinerge Interneurone reguliert wird (Überlappung striataler dopaminergener Neurone durch cholinerge Fasern), die als gepulste Ach-Quelle wirken, um die Dopaminfreisetzung über prä- und postsynaptische nACh-Rezeptoren (hoch Ca^{2+} permeabel) zu modulieren. Die Anzahl der auffällig großen Neurone im Striatum (2-3%) ist klein. Wichtig ist dabei, dass ihre dendritischen Verzweigungen ein dichtes Netzwerk im Striatum bilden, dessen Verteilung der dopaminergen Enden sehr ähnlich ist. Cholinerge Interneurone sekretieren tonisch Ach, das die Freisetzung von Neurotransmittern aus striatalen dopaminergen Neuronen und auch in geringerem Maße aus kortikalen glutamatergen Terminalen moduliert (Gotti et al., 2009; Quik et al., 2011; Zoli et al., 2002). Das heißt, dass eine fortlaufende Rezeptor-Aktivität die Dopaminfreisetzung stark beeinflusst (Dajas-Bailador and Wonnacott, 2004; Zhou et al., 2002a). Somit reduziert die nigrostriatale Läsion die nACh-Rezeptor-vermittelte Dopaminfreisetzung an MP-Mäusen, Ratten und Affen. Studien zeigen, dass besonders die striatalen nACh-Rezeptor-Subtypen bei striataler dopaminergener Denervierung erniedrigt sind. Nigrostriatale Degeneration führt zu differentiellem Rezeptor-Subtypverlust in Abhängigkeit vom Ausmaß der Schädigung, was bedeutet, dass eine Abnahme des hier beschriebenen $\alpha 4\beta 2$ -Subtyps nur bei sehr starker Degeneration dopaminergener Neurone stattfindet (Bordia et al., 2007; Gotti et al., 2009; Quik et al., 2011). Dieser degenerationsabhängige Rezeptor-Subtypverlust führte zu der Hypothese, dass die verschiedenen Subtypen des nACh-Rezeptors auf verschiedenen neuronalen

Populationen vorhanden sind, von denen einige anfälliger für neurodegenerative Prozesse sind als andere (Quik et al., 2011).

mAch-Rezeptoren (M₁-M₃)

Betrachtet man nun die Verteilung der RD der Muskarinrezeptoren im Rattenhirn, so haben alle 3 Muskarinrezeptoren eine höhere RD als die nAch-Rezeptoren im ZNS. Der M₁-Rezeptor weist besonders im AcB, im DG und in der CA1 Region eine sehr hohe RD auf. Interhemisphärische Differenzen innerhalb der Kontrollgruppe lagen in allen Hirnarealen im nicht signifikanten Bereich. Vergleicht man die Kontrollwerte mit anderen Arbeiten so sieht man in den Werten der RD von Bauer et al. Annäherungen, die aber im Vergleich zu den Arbeiten von Palomero-Gallagher et al. oder Haghír et al. ein vielfaches der Dichtewerte darstellen (Bauer et al., 2005; Haghír et al., 2009; Palomero-Gallagher et al., 2008). Übertroffen werden alle Werte von Cremer et al. (Tabelle 5 Anhang) (Cremer et al., 2015). Der M₂-Rezeptor hat für seinen Agonisten [³H]-Oxotremorin im Schnitt eine 4-5 fach geringere RD als mit den Antagonisten des M-Rezeptors erzielt wurde. Seine höchste RD liegt im CG. Die Vergleichswerte der Arbeit von Cremer et al. kommen den hier ermittelten Werten am nächsten, die Werte der übrigen Arbeiten liegen unter den ermittelten RD-Werten (Tabelle 5 Anhang). Der M₂-Antagonist [³H]-AF-DX 384 weist eine 4-5fach höhere RD als mit dem Agonisten desselben Rezeptors ermittelt wurde. Die höchste Dichte ist im Striatum verzeichnet. Vergleiche mit anderen Arbeiten führen zu denselben Ergebnissen, wie mit den Agonisten des Rezeptors ermittelt wurde (Tabelle 5 Anhang). Der M₃-Rezeptor hat mit Abstand die höchste RD im ZNS, besonders im Hippocampus und Striatum. Vergleiche mit anderen Arbeiten zeigen auch hier Ähnlichkeiten in den Werten der Arbeit von Cremer et al. und Abweichungen im Vergleich zu den übrigen Arbeiten (Tabelle 5 Anhang). Gründe für uneinheitliche Literaturangaben wurden bereits für den nAch-Rezeptor benannt.

Bisherige Forschungen, welche die striatalen Veränderungen im post mortem MP-Gehirn am Menschen analysierten, ergaben nachfolgende Ergebnisse. So war die spezifische [³H]-Pirenzipin-Bindung (M₁) im frontalen Kortex MP-Erkrankter unverändert, im Hippocampus, erhöht und im CPu vermindert. Die Werte für die spezifische [³H]-Oxotremorin-M-Bindung (M₂) waren dabei im Kortex reduziert und im Hippocampus und Striatum im Vergleich zu den Kontrollen unverändert (Lange et al., 1993). Dagegen fanden McOmish et al. kürzlich keine striatalen Veränderungen der M₁- ([³H]-Pirenzipin) und M₂-RD ([³H]-AF-DX 384), aber eine erhöhte M₃-RD ([³H]-4-Damp) im CPu und dem Broadmanareal 9 von MP-Patienten

(McOmish et al., 2017). Piggott et al. haben mit den *in vivo* Liganden [^3H]-Pirenzipin für M_1 mittels Autoradiographie im CG eine leichte Reduktion der RD im Vergleich zu den Kontrollen (30%, nicht signifikant) sowie im CPu und GP keine Veränderungen festgestellt. Für [^3H]-AF-DX 384 ($M_{2/4}$) wurde von ihnen im CPu eine leichte Reduktion (11%), im CG eine leichte Erhöhung (12%) und im GP keine Abweichungen gefunden (Piggott et al., 2003). Auch Aubert et al. untersuchten Veränderungen im menschlichen post mortem MP-Kortex und fanden für M_1 mit [^3H]-Pirenzipin keine Veränderungen in der RD. Für den M_2 -Rezeptor mit [^3H]-AF-DX 116 stellten sie eine signifikante Abnahme von 67% im Hippocampus, von 55% im frontalen Kortex und von 39% im temporalen Kortex, jedoch keine signifikante Veränderung der RD im Thalamus und CPu fest (Aubert et al., 1992). Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu den gemessenen Werten am Rattenkortex ergeben sich unter anderem aus der Spezifität der verwendeten Liganden, sowie dem Stadium der Erkrankung, in dem sich der Patient zum Zeitpunkt des Todes befand.

Die hier verwendeten Subtypen haben jeweils spezifische Liganden, für welche sie eine hohe bzw. niedrige Affinität haben. M_2 -Rezeptoren enthalten dabei immer eine Bindungsstelle mit hoher und niedriger Affinität (Birdsall et al., 1978; Giraldo et al., 1987). Für diese Experimente wurde für die hochaffine Bindungsstelle für M_2 der Agonist [^3H]-Oxotremorin und für die Bindungsstelle mit hoher und niedriger Affinität der Antagonist [^3H]-AF-DX 384 verwendet. Dabei muss berücksichtigt werden, dass [^3H]-AF-DX 384 ebenfalls an die antagonistische Stelle des M_4 -Rezeptors bindet, wobei rund 80% der markierten Stellen dieses Liganden (besonders AcB, CPu und Tuberculum olfactorium) im Mausstriatum dem M_4 - und nicht dem M_2 -Rezeptor entsprechen (Hersch et al., 1994; Levey et al., 1991; Valuskova et al., 2018). Auch Studien am humanen ZNS zeigen eine erhöhte Konzentration von Markierungen von [^3H]-AF-DX 384 an M_4 (Piggott et al., 2002). Dieser Aspekt erklärt die Tatsache, dass in den Experimenten eine ungefähr drei bis vier Mal höhere mittlere RD mit [^3H]-AF-DX 384 als mit dem insgesamt mehr M_2 -Subtyp-spezifisches [^3H]-Oxotremorin ermittelt wurde. Dies wird auch in einer Studie von Svensson et al. benannt, die besagt, dass die Bindungsstellen mit hoher Affinität von [^3H]-AF-DX 384 etwa 27% ausmachen und die Niederaffinitätsstelle etwa 73%, dagegen aber die Bindung mit hoher Affinität von [^3H]-Pirenzipin ~76% ausmachten (Svensson et al., 1992). In Versuchen über [^3H]-AF-DX 384 im Vergleich zu einen unspezifischen Antagonist [^3H]-N-Methylscopolamin haben Tränkle et al. zudem folgendes festgestellt, dass [^3H]-AF-DX 384 bei seiner Bindung an freie M_2 -Rezeptoren nicht nur die orthosterische Bindungsstelle, sondern zusätzlich auch Haftstellen an der

allosterischen Bindungsstelle (niedrige Affinität) besetzt. Sie spekulierten weiter, dass [^3H]-AF-DX 384 seine M_2 -Selektivität möglicherweise aus Haftpunkten des allosterischen Bindungsareals bezieht (Tränkle et al., 1998).

Auffällig in den Ergebnissen dieser Arbeit war weiterhin, dass nur die [^3H]-AF-DX 384-Bindung nach 6-OHDA-Läsion stärker abnahm und sich nach BoNT-A-Injektion langsam den Kontrollwerten wieder annäherte, während man bei der [^3H]-Oxotremorin-Bindung kaum auffällige Veränderungen nach Läsion und Therapie feststellen konnte. Nach aktuellen Kenntnissen ist aber nicht bestätigt, ob dieser Effekt aufgrund der vermehrten Bindung an M_4 -Rezeptoren entstanden ist.

Vergleicht man nun die hier ermittelten Ergebnisse für die einzelnen Subtypen des mACh-Rezeptors mit Werten anderer Forschungsarbeiten, so stellt man auch hier Unterschiede und Gemeinsamkeiten fest (Tabelle 6 Anhang). Für den Subtyp M_1 zeigten Araki et al., dass sich 8 Wochen nach unilateraler 6-OHDA-Injektion in den MVB die striatale Bindung von [^3H]-QNB (M_1) um 12-17% verringerte. Gegenteilig fanden die Autoren auch im kontralateralen Striatum eine signifikante Steigerung der [^3H]-QNB-Bindung, mit einer über 8 Wochen ansteigende Tendenz (Araki et al., 2000). Ähnliche Experimente führten zu einer striatalen Abnahme der M_1 -RD von 26% unter Verwendung des auch hier verwendeten selektiven Antagonisten [^3H]-Pirenzipin etwa 1 Jahr nach Läsionierung (Dawson et al., 1991). Ebenfalls eine Abnahme der [^3H]-Pirenzipin-Bindung von 15% bis 29% 3 Wochen nach intra-nigraler 6-OHDA-Injektion fanden Joyce et al. im ipsilateralen Striatum. Der Verlust von Dopamin führte auch dort zu einer Verringerung der M_2 -RD (24-30%), die mit dem Anstieg der ACh-Aufnahme-Stellen korrelierte. Im Gegensatz dazu zeigte M_1 ([^3H]-Pirenzipin) eine geringere Reduktion der RD nach dem Verlust von Dopamin (Joyce, 1991). Widersprüchliche Ergebnisse ergaben Forschungen von Wang et al., die keine Änderungen im CPu 3 Wochen nach 6-OHDA-Läsion im MVB mit [^3H]-Pirenzipin-Bindung gefunden haben, aber eine Reduktion von $M_{1/4}$ -Rezeptoren im Hippocampus, der medialen Amygdala, dem posteromedialen kortikalen und dem piriformen Kortex (Wang et al., 2014b). Knol et al. fanden ebenfalls mit der [^{123}I]-Iodexetimid-SPECT-Methode keine Veränderung im CPu für M_1 , aber eine Abnahme der neokortikalen M_1 -Rezeptoren (Knol et al., 2014). Cremer et. al. fanden leichte Reduktionen der RD mit [^3H]-Pirenzipin im CPu (17%), im Hippocampus (5-9%) und im Kortex (DG 12%, S 8%). In den Hirnarealen dieser Promotionsarbeit ist für die kortikalen Regionen (M, S, CG) des M_1 -Rezeptors eine nicht signifikante Steigerung der RD von 6-15% sichtbar, während im Hippocampus die RD unverändert bleibt (+2%). Nur im

Striatum verringert sich die RD (CPu = 6% und AcB 1%), was den ermittelten Werten von Cremer et al. ähnelt, trotz verschiedener Versuchstiere, -planung und -durchführung.

Für die autoradiographische Untersuchungen des mACh-Rezeptor-Subtyps M₂ nutzen wir [³H]-Oxotremorin als selektiven Agonisten an den hochaffinen Bindungsstellen. In der vorliegenden Arbeit war für diesen M₂-Liganden nur im DG, CPu und der SN eine leichte Verringerung (2-7%) der RD erkennbar, während die RD bis auf der Region M (+10%) konstant blieb. Verglichen mit anderen Forschungsarbeiten haben u.a. Joyce et al. die RD von M₂ unter Verwendung von [³H]-NMS in Gegenwart von unmarkiertem Pirenzipin gemessen. Dabei sank die RD um 24-30% im CPu nach intranigraler 6-OHDA-Injektion (Joyce, 1991). Gemeinsamkeiten sind auch hier in Pitx3ak-Mäuse sichtbar, die einen starken Verlust an dopaminergen Zellen in der SNpc aufwiesen, wo die M₂-RD (für [³H]-Oxotremorin) in der CPu signifikant um 19% reduziert war. In anderen Arealen wurde teils eine Reduktion (S 12%, SN 7% und M 3%) wie auch eine Steigerung (DG 5% und Hippocampus 2%) beobachtet (Cremer et al., 2015). Andere Studien zeigen mittels Mikrodialyse, dass 3 Wochen nach 6-OHDA-Läsionierung eine Normalisierung der Anzahl von M₁-Rezeptoren und ein Verlust von M₂-Rezeptoren auf der denervierten Seite vorlagen. Die basale Freisetzung von neu synthetisiertem Dopamin in striatalen Abschnitten durch Ach wird durch mACh-Rezeptoren verstärkt. Ach stimuliert die Freisetzung von [³H]-Dopamin und kann durch Muscarin-Antagonisten blockiert werden. (de Klippel et al., 1993). Bellerocche et al. beschrieben 7-14 Tage nach Injektion des 6-OHDA in das VTA männlicher Wistar-Ratten eine signifikante Reduktion der [³H]-Oxotremorin-Bindung im ipsilateralen AcB von 9-15%. Die Autoren schließen eine Veränderung der Bindungsaffinität von [³H]-Oxotremorin als Ursache der Reduktion der RD aus und vermuten die Lokalisation der mACh-Rezeptoren auf dopaminerge Terminale im AcB, die wie beim nACh-Rezeptor die Reduktion der RD erklären könnte (Bellerocche et al., 1982). Letzteres zeigten auch Liskowsky et. al., die Ratten 4 Wochen nach Läsionierung des VTA mit 6-OHDA untersuchten und eine Reduktion der RD im frontalen Kortex von 13% mit [³H]-Oxotremorin feststellten (Liskowsky and Potter, 1985). Wie auch bei M₁ kann die Reduktion der RD durch eine kompensatorische Herunterregulierung von Rezeptoren auf der Zelloberfläche infolge des Hyperacetylcholinismus ausgelöst sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit für den Antagonist [³H]-AF-DX 384 des M₂-Rezeptors zeigen eine nicht signifikante Verringerung der RD im CPu sowie im AcB und der SN (10-14%). In den übrigen Arealen stieg die RD zwischen 3 -13% an (besonders M, S, CG). Auch hier ist

ein direkter zytotoxischer Effekt des Neurotoxins 6-OHDA aufgrund der spezifischen Lokalisation der Subtypen unwahrscheinlich. Cremer et al. fanden in ihrer Arbeit für nahezu alle Hirnareale an Pitx3ak-Mäusen eine Steigerung der M₂-RD für diesen Liganden (Kortex 3-13%, Hippocampus 2-4% und SN 12%). Nur im CPu wurde keine Veränderung der M₂-RD beobachtet (Cremer et al., 2015).

Ähnlich war auch das Bindungsverhalten für den Liganden des M₃-Rezeptors. In der SN war die stärkste nicht signifikante Reduktion (16%). Auch im CPu (3%) und AcB war eine leichte Reduktion zu verzeichnen. In den übrigen Arealen, besonders Kortex und Hippocampus, wurde eine Steigerung der RD (2-10%) beobachtet. Es wurde keine signifikante Veränderung der RD gemessen. Abweichend waren die Ergebnisse im CPu von Pitx3ak-Mäuse, bei denen Cremer et al. zwar ebenfalls keine signifikante Änderungen der M₃-RD gefunden hatten, aber die RD u.a. im Kortex (13-21%), dem CPu (3%) und der SN (15%) gestiegen ist (Cremer et al., 2015).

Bei der Induzierung von Hemiparkinson durch 6-OHDA-Injektion haben wir auf die Gabe von Desipramin (trizyklisches Antidepressivum) verzichtet (Mailman, 1983; Nash and Brotchie, 2002), um die Vergleichbarkeit dieser Studie mit bisherigen Ergebnissen einschließlich BoNT-A-Behandlung zu gewährleisten (Antipova et al., 2013; Mehlan et al., 2016; Wree et al., 2011).

Da es bisher keine konkreten Beweise in der neueren Literatur für die Lokalisierung von mACh-Rezeptor-Subtypen auf dopaminergen Axon-Terminalen gibt (Jones et al., 2001; Zhou et al., 2002a), kann die Reduktion der mACh-RD nicht sicher durch eine 6-OHDA-induzierte axonale Degeneration erklärt werden. Daher wäre ein durch den Dopaminverlust im Striatum induzierter Hypercholinismus vielmehr eine mögliche Ursache für die Herunterregulation der RD auf der Zelloberfläche, ohne die Zahl der Zellen zu vermindern (DeBoer et al., 1993; Rakovska et al., 2003). Aufgrund der Zerstörung dopaminerger Axon-Termine sinkt der hemmende Einfluss des Dopamins auf die tonisch aktiven zellulären Interneurone und es kommt mit Steigerung der Konzentration natürlicher Agonisten zu einer konsekutiven Rezeptordesensitisierung und zu einem Abbau der mACh-Rezeptor auf der Zelloberfläche (Dawson et al., 1991). Die Annahme stimmt weiterhin mit den Ergebnissen aus der Studie überein, die chronisch Acetylcholinesterase injiziert, welches ebenfalls zu einer erhöhten Ach-Konzentrationen führt und somit zu einer signifikanten Abnahme von ca. 20% der mACh-RD (mit [³H]-QNB-Bindung) (Sivam et al., 1983; Yamada et al., 1983).

Die im Vergleich zu den nAch-Rezeptoren eher milde Reduktion der RD bestätigt weiterhin die Vermutung, dass die Rezeptorsubtypen nicht auf den gleichen neuronalen Subtypen lokalisiert sind, wie der nAch-Rezeptoren und somit kein direkter neurotoxischer Effekt (Dopaminverlust) durch 6-OHDA für die Reduktion der RD verantwortlich ist (Darstellung der Lokalisation in Kapitel 1.4.2-1.4.4). Wie bei dem nAch-Rezeptor wurden auch hier alle Ergebnisse über einen Zeitraum von bis zu 3 Monaten (LV) ermittelt. Für den Liganden des M₁-Rezeptor [³H]-Pirenzipin sind keine zeitlichen Schwankungen der Gruppe LV in allen Hirnarealen gefunden worden. Für die Liganden [³H]-Oxotremorin, [³H]-AF-DX 348 des M₂-Rezeptors und [³H]-4-Damp (M₃) wurden ähnliche Ergebnisse ermittelt. Es konnte somit keine Auswirkung der Vehikel-Injektion bei allen drei Rezeptor-Subtypen festgestellt werden, was bedeutet, dass die Veränderung der RD lediglich auf die Auswirkung der Läsionierung mit 6-OHDA zurückzuführen ist.

4.3 Rezeptordichten der LV Ratten für glutamerge Rezeptoren

Glutamat ist ein wichtiger Rezeptor in der Verschaltung der Basalganglien. Die Glutamat-Neurotransmission macht etwa 70% der synaptischen Transmission im ZNS aus, was Glutamat zum am häufigsten vorkommenden exzitatorischen Neurotransmitter macht. Die SN ist die einzige exzitatorische Struktur, die den Basalganglien eigen ist, und es wird angenommen, dass ihre Läsionierung auch Veränderungen in der Aktivität und Dichte der Glutamat-Rezeptoren bewirkt (Platt, 2007).

Die Existenz glutamaterger Nervenendigungen an nAch-Rezeptoren, die eine Verstärkung der Glutamat-Freisetzung vermitteln, wurde oft vorgeschlagen, aber nicht direkt bewiesen. Glutamerge Axonendigungen im humanen Neokortex und im Rattenstriatum weisen $\alpha 7$ nikotinische Heterorezeptoren auf, die eine Verstärkung der Glutamat-Freisetzung vermitteln. Freisetzungsfördernde cholinerge Autorezeptoren im humanen Neokortex sind nAch-Rezeptoren mit einem pharmakologischen Profil, dass mit der $\alpha 4\beta 2$ -Untereinheits-Kombination kompatibel ist (Marchi et al., 2002). Auch Kaiser et al. beschrieben, dass die nAch-Rezeptor-Aktivierung die Glutamat-Freisetzung beeinflussen kann (Kaiser and Wonnacott, 2000). Es gibt zudem Hinweise darauf, dass speziell NMDA-Rezeptoren auch an striatalen dopaminergen Enden vorliegen und die Dopaminfreisetzung verstärken können bzw. bei dopaminergen Läsionen Veränderungen in der RD zeigen können (Desce et al., 1992).

Als exzitatorischer Neurotransmitter spielt Glutamat eine zentrale Rolle in der normalen Schaltung der Basalganglien. Bei nigrostriataler dopaminerger Depletion werden die glutamergen Projektionen vom STN zu den Ausgangskernen der Basalganglien überaktiv und in diesen Regionen kommt es dann zu regulatorische Veränderungen der Glutamat-Rezeptoren. Es gibt auch Hinweise auf eine erhöhte glutamerge Aktivität im Striatum. In Tiermodellen verbessert die Blockade von Glutamat-Rezeptoren die motorischen Manifestierungen von MP. Daher scheint es, dass abnormale Muster der glutamergen Neurotransmission bei den MP-Symptomen von Bedeutung sind. Die Beteiligung des glutamergen Systems in der Pathogenese und Symptomatologie von MP bietet potentielle neue Ziele für die Therapie dieser Erkrankung (Blandini et al., 1996).

Kainat-Rezeptor

Vergleicht man in dieser Arbeit ermittelte RD-Werte mit bereits publizierter Literatur, so sieht man auch hier Ähnlichkeiten in Werten von Cremer et al. und Abweichungen in den übrigen Publikationen (Tabelle 7 Anhang) (Cremer et al., 2015). Gründe dafür sind u.a. abweichende Versuchsplanungen und -durchführungen, wie sie oben bereits benannt wurden. Der Kainat-Rezeptor weist besonders im Striatum und der CA3- sowie der CG-Region eine hohe RD auf.

Vergleichbare Werte aus der Literatur von post mortem Gehirnen menschlicher MP Erkrankter sind nach aktuellem Kenntnisstand nicht vorhanden, da der Rezeptor selber bis zum heutigen Zeitpunkt noch weitgehend unerforscht ist.

Die RD war nahezu konstant. In kortikalen Arealen konnte eine schwache Steigerung von 8-10% festgestellt werden. Im GP und AcB wurde dagegen eine leichte Reduktion von 2-7% ermittelt. Über die Überlebenszeit der Ratten betrachtet, konnte für den Liganden [^3H]-Kainat des Kainat-Rezeptors keine größeren Schwankungen der RD in den verschiedenen Hirnarealen nach Vehikel-Injektion ermittelt werden (Abb. 22 Anhang). Somit hat auch hier die Injektion der Vehikellösung keine Auswirkung auf die RD.

Verglichen mit Angaben andere Autoren, die Veränderungen der Bindung selektiver Radioliganden an Kainat ([^3H]-Kainat) u.a. im CPu und AcB mittels quantitativer Autoradiographie von Ratten untersuchten (nach nigraler 6-OHDA-Läsion), ergaben kleinere, aber signifikante Verluste in der RD von Kainat (-11%) im CPu. Das Ergebnis zeigt zudem, dass die meisten Kainat-Rezeptoren im CPu und AcB auf intrinsischen postsynaptischen

Neuronen vorkommen (Tarazi et al., 1998). In einer weiteren Arbeit beschreiben Tarazi et al. ebenfalls Veränderungen der ionotropen Kainat-Rezeptor-Bindung im Ratten CPu. 5 Wochen nach der Läsionierung der SN (unilateral) mit 6-OHDA wurde dort die RD mit *in vitro* Rezeptorautoradiographie untersucht. Es erhöhte sich die RD im CPu (mit [3 H]-Kainat) um signifikante 20% (Tarazi et al., 2000). Wüllner et al. untersuchten [3 H]-Kainat (Kainat) Bindungsstellen in Neostriatum und SNpr bei Ratten nach einseitiger 6-OHDA-Läsionierung im MVB. Eine Woche nach der Läsion war der Kainat-Rezeptor im ipsilateralen Neostriatum um 10% verringert, während nach 3 Monaten keine Veränderung mehr vorhanden war. In der SNpr waren drei Monate nach der Läsion ebenfalls die Kainat-Bindungsstellen verringert (Wüllner et al., 1994). Auch Zavitsanou et al. haben die [3 H]-Kainat-Bindung im CPu und AcB des Ratten-Striatums nach unilateralen Läsionen des rechten MVB unter Verwendung von *in vitro* Rezeptorautoradiographie untersucht. Die Läsion der dopaminergen Fasern mit 6-OHDA führte nach einer und vier Wochen dazu, dass die maximale Anzahl von [3 H]-Kainat-Bindungsstellen im CPu und AcB der läsionierten Seite des Gehirns signifikant verringert war. Dieser Rückgang lag zwischen 17% und 26%. All diese Ergebnisse legen nahe, dass mindestens ein Viertel bis ein Fünftel der Kainat-Rezeptoren im CPu und AcB an den präsynaptischen Enden von Dopamin-Fasern lokalisiert sind, die dem MVB folgen. Somit spielen diese nicht-NMDA-Glutamat-Rezeptoren eine Rolle bei der präsynaptischen Regulation der Dopamin-Freisetzung im Striatum. Die Ergebnisse zeigen auch, dass die nigrostriatale Dopamindenerverung selektiv den Kainat-Rezeptor-Spiegel in Basalganglien der Ratte erhöhen kann, was auch für einige Hirnareale dieser Arbeit zutrifft. Das deutet darauf hin, dass diese Rezeptoren zur Pathophysiologie des MP beitragen können (Zavitsanou et al., 1996). Für die weiteren hier bestimmten Hirnareale liegen zum derzeitigen Zeitpunkt keine vergleichbaren Werte in der Literatur vor. Eine Übersicht zu den derzeitigen Forschungsergebnissen befindet sich in Tabelle 10 (Anhang).

mGlu2/3-Rezeptor

Metabotrope Glutamat-Rezeptoren regulieren die striatale exzitatorische synaptische Übertragung. Der mGlu-Rezeptor hat sein Hauptvorkommen in den kortikalen Arealen. Vergleiche mit der Literatur zeigen ähnliche Werte von Wright et al. in ihren Versuchen mit Sprague-Dawley Ratte, wo sie für die Regionen Kortex, Striatum und Hippocampus Werte von 2477, 2126 bzw. 1940 fmol/mg Protein erzielten (Wright et al., 2001). Cremer et al. fanden für jedes Hirnareal nahezu doppelt so hohe RD bei identischen Liganden in anderen

Versuchstieren (Tabelle 8 Anhang) (Cremer et al., 2015). Auch hier sind die Gründe für die unterschiedlichen Literaturangaben in den RD-Werten wie bereits oben beschrieben.

In Vergleichen mit post mortem Studien aus der Literatur fanden Samadi et al. mittels des [^3H]-LY 341/495 Liganden und Autoradiographie eine Reduktion der RD im Nucleus caudatus und GP (-22% Caudatus, -30% GP), verglichen mit Kontrollen. Unter MP-Patienten mit oder ohne Dyskinesien fanden sie keine Unterschiede (Samadi et al., 2009).

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden keine signifikanten Veränderungen der RD nach 6-OHDA-Läsion gefunden. Im GP war eine Abnahme von 12% zu erkennen. In allen anderen Arealen war die RD konstant, bis auf dem S, wo sie um ~35% anstieg. Auch in Abhängigkeit der Überlebenszeit der Ratten wurde für den Liganden [^3H]-LY 341/495 für die verschiedenen Hirnareale ebenfalls keine Schwankungen der RD nach Vehikel-Injektion verzeichnet (Abb. 23 Anhang). Somit hat auch hier die Applikation eines Wirkstoffs keine Auswirkungen auf die RD.

Verglichen mit Angaben aus anderen Tiermodelle fanden u.a. Picconi et al. in Ratten-Striata, die einseitig mit 6-OHDA läsioniert wurden mit Hilfe des selektiven Agonisten [^3H]-LY 379/268 folgendes: Die Expression von mGlu2/3-Rezeptoren wurde im denervierten Striatum der Ratten hochreguliert. Im kontralateralen Striatum wurden keine Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollratten beobachtet (Picconi et al., 2002). Auch Jourdain et al. haben mittels Autoradiographie die RD an MPTP-Affen für den mGlu2/3-Rezeptor (Ligand [^3H]-LY 341/495) bestimmt. Das MPTP bewirkte eine Zunahme der Bindung von striatalen [^3H]-LY 341/495 im medialen Teilen des Nucleus caudatus und ventromedialen Putamen und blieb unverändert in den lateralen Teilregionen des Striatums (Jourdain et al., 2015). Auch Wüllner et al. untersuchten die metabotrope [^3H]-Glutamat Bindungsstellen in Neostriatum und SNpr bei Ratten nach einseitigen 6-OHDA-Läsionierung im MVB. Eine Woche nach der Läsion waren die metabotropen Rezeptoren im ipsilateralen Neostriatum verringert (10%). Auch in der SNpr waren diese nach einer Woche signifikant verringert. Die frühe Abnahme der exzitatorischen Aminosäurerezeptoren im Striatum kann auch hier wie beim Kainat-Rezeptor die Degeneration von dopaminergen Fasern widerspiegeln, was bedeutet, dass spezifische Subpopulationen von exzitatorischen Aminosäurebindungsstellen an dopaminergen Terminalen lokalisiert sein können (Wüllner et al., 1994). Für die weiteren Areale liegen auch hier derzeit keine Vergleichswerte aus der publizierten Literatur vor. Eine Übersicht zu den derzeitigen Forschungsergebnissen befindet sich in Tabelle 10 (Anhang).

NMDA-Rezeptor

Das NMDA-System interagiert eng mit dem dopaminergen System und ist stark an den pathophysiologischen Mechanismen und therapeutischen Paradigmen des MP beteiligt. Vergleicht man die hier gemessenen RD mit Werten aus der Literatur, so sieht man in den Arbeiten von Bauer und Cremer et al. sehr ähnliche Werte (Bauer et al., 2005; Cremer et al., 2015). Die Angaben der übrigen Arbeiten zeigen im Schnitt eine 2-5 fach geringere RD (Tabelle 9 Anhang). Gründe für solche Schwankung der RD wurden bereits oben erwähnt.

Verglichen mit Werten aus der Literatur, fanden Gerlach et al. eine Reduktion der RD für die Bindung von [^3H]-MK-801 im post mortem menschlichen Hirngewebe von -42% für dem Nucleus caudatus (Gerlach et al., 1996).

In dieser Arbeit wurde die höchste RD im Hippocampus gemessen. Die Veränderungen der RD belaufen sich auf eine nicht signifikante schwache Reduktion der RD im CPu und DG, die stärkste Erhöhung war im S, bei einer nahezu konstante RD in den restlichen Arealen. Auch zeitliche Schwankungen in der Versuchsgruppe LV konnten nicht ermittelt werden, was einen Effekt der Applikation eines Wirkstoffs auf die RD ausschließt (Abb. 24 Anhang).

Vergleiche mit Angaben aus der Literatur von Qing Wang et al. zeigen die Veränderungen von NMDA-Rezeptoren in einer Vielzahl von Hirnstrukturen 3 Wochen nach der einseitigen MVB-Läsionierung durch 6-OHDA (mit [^3H]-MK-801, Autoradiographie). Im 6-OHDA-induzierten Parkinson-Rattenmodell ermittelten sie über den nigrostriatalen dopaminergen Neuronen-Verlust eine signifikante Verminderung der [^3H]-MK-801-Bindung, vorwiegend im Hippocampus (-22,4%, $p < 0,001$) CPu (-14,1%, $p < 0,01$), AcB (-13,8%, $p < 0,05$), CG (-13,4%, $p < 0,001$), posteromediale kortikale Amygdala (-14,5%, $p < 0,01$) und piriformer Kortex (-9% , $p < 0,05$), verglichen mit den Kontrollen. Die [^3H]-MK-801-Bindung in spezifischen Gehirnregionen, die mit kognitiven Funktionen in Zusammenhang stehen, könnten anzeigen, dass kognitive Störungen, die durch 6-OHDA-Läsion verursacht wurden, über das NMDA-System erfolgten. Die Herunterregulierung der NMDA-Rezeptorbindung in ihrer Forschung liefert somit einen indirekten Nachweis für die Plastizität des NMDA-Systems im Rattengehirn. Die höchste Dichte fanden auch sie im Hippocampus, präfrontalen Kortex und der Amygdala. Die Destruktion des dopaminergen nigrostriatalen Weges durch die MVB-Läsion vermittelte eine offensichtliche Herunterregulierung der NMDA-Rezeptorbindung, was bedeuten kann, dass der Verlust dopaminerge Afferenzen die Expression des NMDA-Rezeptors im nigrostriatalen Signalweg verringerte. Diese

Hypofunktion des NMDA-Rezeptors im nigrostriatalen Signalweg könnte entweder auf die glutamergen Hypo-Innervationen oder die reduzierte Anzahl an glutamergen Terminalen nach MVB-Läsion zurückzuführen sein. Zudem kann die Herunterregulierung des NMDA-Rezeptors im 6-OHDA-geschädigten Rattenhirn eine kompensatorische Reaktion auf die überaktiven glutamergen Inputs nach nigrostriataler Dopamindenervierung sein. Weiterhin ist zu beachten, dass dopaminerge Neurone im mesokortikalen Pfad vom VTA und dem medialen SNpc zum Frontallappen projizieren. Die dopaminerge Störung bei MP beeinflusst nicht nur den nigrostriatalen Trakt, sondern auch den mesokortikalen Pfad. So beschreiben Wang et al., dass das NMDA-glutamerge System und die Herunterregulation der NMDA-Rezeptoren in mesokortikalen Regionen eng miteinander verknüpft sind und eine entscheidende Rolle bei der Gedächtnisdepression spielen (Wang et al., 2014a). Verglichen mit Angaben weiterer Autoren, die die Veränderungen der Bindung des selektiven Radioliganden von NMDA ($[^3\text{H}]$ -MK-801) im CPu und AcB mittels Autoradiographie von Ratten untersuchten (nach nigraler 6-OHDA-Läsion), ergaben kleinere, aber signifikante Verluste in der RD von NMDA (17%) im CPu. Die Ergebnisse zeigen zudem, dass die meisten NMDA-Rezeptoren in Ratten-CPu und AcB auf intrinsischen postsynaptischen Neuronen vorkommen. Einige NMDA-Rezeptoren wurden auch auf kortikostriatalen Projektionen in Verbindung mit Dopamin₄-Rezeptoren gefunden. Diese können jeweils exzitatorische präsynaptische NMDA-Autorezeptoren und inhibitorische D₄-Heterorezeptoren darstellen, die die Glutamat-Freisetzung aus kortikostriatalen Axonen des medialen CPu und AcB regulieren (Tarazi et al., 1998). In einer weiteren Arbeit beschreiben Tarazi et al. ebenfalls Veränderungen der NMDA-Rezeptor-Bindung in Ratten CPu. 5 Wochen nach der Läsionierung der SN (unilateral) mit 6-OHDA wurde die RD mit quantitative *in vitro* Rezeptorautoradiographie untersucht. In diesem Tiermodell veränderte sich die RD der NMDA-Rezeptoren (mit $[^3\text{H}]$ -MK 801) (-3%) kaum (Tarazi et al., 2000). Auch Jourdain et al. haben mittels Autoradiographie die RD an MPTP-Affen für den NMDA-Ligand $[^3\text{H}]$ -RO 25 6981 bestimmt. Das MPTP hatte keine Veränderung der NMDA-RD bewirkt (Jourdain et al., 2015). Wüllner et al. untersuchten mit dem NMDA-sensitive Liganden $[^3\text{H}]$ -Glutamat in Neostriatum und SNpr bei Ratten nach einseitigen 6-OHDA-Läsionierung im MVB die RD. Eine Woche nach der Läsion war der NMDA Rezeptoren im ipsilateralen Neostriatum verringert (10%), während dieser nach drei Monaten dann erhöht (13%) war. In der SNpr waren drei Monate nach der Läsion die NMDA-Bindungsstellen verringert. Die frühe Abnahme der exzitatorischen Aminosäure-Rezeptoren im Striatum spiegelt möglicherweise auch hier die Degeneration von dopaminergen Fasern wieder (Wüllner et al., 1994).

Interessanterweise wurden auch einige widersprüchliche Ergebnisse beobachtet. He et al. beobachteten eine Verteilung von [125 I]-MK-801-Bindungsstellen mit der stärksten Expression in der äußeren Kortex, Hippocampus, Tuberculum olfactorius und CPu. Hohe Werte wurden auch im Thalamus, AcB und im Kortex beobachtet. Ihre Studien mit Totenkopffaffen zeigten, dass in MPTP-induziertem Affen die [3 H]-MK-801-Bindung im CPu unverändert verglichen mit normalen Kontrollen war. Das kann auf folgenden Gründe zurückzuführen sein: (1) Sie verwendeten das MPTP-läsionierte Affen-PD-Modell und wir das 6-OHDA-läsionierte Ratten-PD-Modell. (2) Wir haben die NMDA-Rezeptor-Bindung bereits 3 Monate nach der 6-OHDA-Läsion gemessen (LV). Sie führten die Messung erst 4 Monate nach der MPTP-Läsion durch. Diese Gründe können u.a. Ursache der Abweichungen sein, was auch für die Abweichungen der Angaben aus den anderen publizierten Literaturen gilt. Das Toxin führte bei ihnen zu keiner Veränderungen der RD (He et al., 2000). Auch Betarbet et al. beschrieben in ihrer Studie nach Läsionierung des MVB mit 6-OHDA unilateral eine offensichtliche Herunterregulierung der NMDA-Rezeptor-Bindung (37%), was ebenfalls darauf hinweist, dass der Verlust der induzierten dopaminergen Afferenzen die Expression des NMDA-Rezeptors im nigrostriatalen Signalweg verringerte. 3 Wochen nach der MVB-Läsion war die NMDA-Rezeptor-Bindung auch in einigen mesokortikalen Regionen, wie dem CG, dem piriformen Kortex und der posteromediokortikalen Amygdala vermindert. Interessanterweise fanden sie auch einen signifikanten bilateralen Rückgang der striatalen MK-801-Bindung bei den einseitig läsionierten Ratten im Vergleich zu den Kontrollratten (Betarbet et al., 2004). Exzitatorische Aminosäure-Rezeptor-Bindungsstellen der SN, des Striatum, des GP und des Kortex waren 2 Wochen nach Injektion von MPTP in C57bl6-Mäuse verringert. Auch der NMDA-sensitive [3 H]-Glutamat Gehalt sank auf 57% im Vergleich zu den Kontrollen im Striatum (Wüllner et al., 1994). Auch Dunah et al. haben die Häufigkeit von NMDA-Rezeptor-Untereinheiten im 6-OHDA-Modell nach Läsion des linken MVB untersucht. Im läsionierten Striatum war die Häufigkeit im Vergleich zu dem nicht-läsionierten Striatum auf 68% bzw. 62% verringert (Dunah et al., 2000). Zuletzt haben auch Gan et al. an Hemiparkinson-Ratten, denen 6-OHDA selektiv in das MVB injiziert wurde, die Oberflächenexpression von NMDA₁-Rezeptor-Untereinheiten durch Western Blot nachgewiesen. Diese waren im Striatum erhöht. Auch die NMDA₂-Rezeptor-Untereinheit war dort erhöht (Gan et al., 2014).

4.4 Rezeptordichten der LB Ratten für acetylcholinerge Rezeptoren nAch-Rezeptor

Mit dieser Versuchsgruppe wurde untersucht, welche Auswirkungen die BoNT-A Applikation auf die RD der verschiedenen Hirnareale der läsionierten Ratten hat. In der Literatur ist bisher wenig zu den genauen Interaktionen von BoNT-A mit dem nACh-Rezeptor bekannt. So wird in Versuchen von Frick et al. und Shen et al. bei Applikation von BoNT-A im Muskelgewebe eine Steigerung der nACh-RD ohne vorherige Läsionierung ermittelt (Frick et al., 2007; Shen et al., 2005). Für die Anwendung im ZNS gibt Antipova et al. eine zusammenfassende Übersicht, allerdings ohne die Auswirkungen des BoNT-A auf neuronale Transmitter-Rezeptoren in den einzelnen Hirnarealen zu beschreiben (Antipova et al., 2013).

In dieser Arbeit wurde eine signifikante Verbesserung der RD nach BoNT-A-Injektion im CPu und AcB des nACh-Rezeptors dokumentiert. Auch in den anderen Hirnarealen ist eine leichte nicht signifikante Steigerung der RD zu verzeichnen, was bedeutet, dass BoNT-A den 6-OHDA bedingten Verlust der nACh-Rezeptoren im CPu und AcB zumindest teilweise kompensiert. Ausnahmen davon sind der Habenularkern und der S. Hier sank die RD im Vergleich zur Gruppe LV weiter ab, was bedeutet, dass dort eine Vergrößerung der Differenz im Vergleich zu der nicht-läsionierten Hemisphäre entstanden ist. Auffällig ist daneben eine sichtbare bilaterale Reduktion der RD nach 3, 6 und 9 Monaten nach BoNT-A-Injektion, besonders für den AcB und das CPu, aber auch in abgeschwächter Form für die anderen Hirnareale (Abb. 17). Die Bilateralität dieses Effekts könnte mit der Fähigkeit des BoNT-A zur neuronalen und axonalen Migration auch weit über den ursprünglichen Injektionsort hinaus zusammenhängen (Antonucci et al., 2008).

Im CPu und AcB war die nACh-RD einen Monat nach BoNT-A-Injektion leicht ipsilateral erhöht. Es wurde auch eine Zeitabhängigkeit festgestellt: Dieser anfänglichen Zunahme nach 3 Monaten in Richtung der Werte der linken Hemisphäre, folgte eine Abnahme der RD über 9 Monate. In Hemiparkinson-Ratten mit BoNT-A (LB) war die interhemisphärische Differenz von nACh-RD im Vergleich zu der Gruppe LV um rund 10% im CPu und AcB verringert, was eine Verbesserung postuliert und eine Erhöhung der durch 6-OHDA stark reduzierten RD bedeutet (Abb. 17 Anhang). Dies bedeutet weiterhin, dass BoNT-A den 6-OHDA bedingten Verlust der nACh-Rezeptoren zumindest anfangs teilweise aufhebt. Scheinbar führte BoNT-A damit zu einem Anstieg von nACh-Rezeptoren in nicht-dopaminergen Strukturen, da dopaminerge Terminale im Hemiparkinson nicht mehr existieren, weil eine Läsionierung durch 6-OHDA die dort lokalisierten Rezeptoren irreversibel zerstört. Denkbar wäre demnach eine Erhöhung des nACh-Rezeptors aus nicht dopaminergen intrastriatalen Neuronen, die ihren Rezeptorbesatz hoch reguliert haben. Potentiell dafür infrage kommen würden

kortikostriatale Afferenzen (Garcia-Munoz et al., 1996) sowie cholinerge (Sandor et al., 1991) und GABAerge (Rover et al., 2002; Koos und Tepper, 2002; McClure-Begle et al., 2009) Interneurone innerhalb des Striatums. Eine anfänglich erhöhte nAch-RD im Vergleich zu Kontrollen und Vehikel-injizierte Hemiparkinson-Ratten kann somit durch die Reduktion von striatalen Ach und einer gleichzeitigen Hochregulierung von nAch-Rezeptoren aus anderen zerebraler Strukturen erklärt werden. Dieser Effekt, verschwindet jedoch nach 6-9 Monaten nach BoNT-A-Injektion, wie es auch in Abbildung 17 (Anhang) sichtbar wird. In den Hirnarealen CPu und AcB war nach BoNT-A-Injektion dieser Effekt der abnehmenden BoNT-A Wirkung über die Zeit am deutlichsten sichtbar (Abb. 17 Anhang). Einzig im Habenularkern und dem sensorischen Kortex stieg in den ersten 3-6 Monaten nach BoNT-A Applikation die Differenz der RD zwischen rechter und linker Hemisphäre (im Vergleich zu LV) und schaffte erst nach 9 Monaten Überlebenszeit der Ratten wieder eine Annäherung der RD-Werte an die Werte der linken Hemisphäre. Ein möglicher Grund kann der durch das BoNT-A unterbundene Hypercholinismus sein. So wird der Transmitter Ach reduziert, was schlussendlich die Dichte der nAch-Rezeptoren in den nicht dopaminergen verhältnismäßig Rezeptor-reichen Arealen beeinflusst, wie es u.a. Hefco et al. beschrieben (Hefco et al., 2004; Sivam et al., 1983).

In bisherigen Forschungen unseres Instituts wurde ebenfalls bei BoNT-A-Verabreichung ein geringfügig verringerter interhemisphärischer Unterschied der nAch- und mACh-RD im CPu in Hemiparkinson-Ratten ermittelt. Der BoNT-A-Effekt war für den nAch-Rezeptoren signifikant (Mann et al., 2018). Ähnliche Ergebnisse konnten auch in anderen Tiermodellen mit weiblichen Mäusen gefunden werden, wo die striatale [³H]-Nikotin-Bindung nach chronischer Infusion mit Physostigmin, einem reversiblen Acetylcholinesterase-Hemmer, signifikant um rund 12% wieder anstieg (Bhat et al., 1990).

mACh-Rezeptoren

Die Veränderung der RD nach BoNT-A-Injektion in Hemiparkinson-Ratten war für alle Liganden der M-Rezeptoren nicht signifikant. Unter Berücksichtigung des zeitlichen Verlaufs der BoNT-A Wirkung in Hemiparkinson-Ratten, nahmen die interhemisphärischen Unterschiede der mACh-RD erst mit zunehmender Überlebenszeit ab. Im einzelnen bedeutet dies für den M₁-Rezeptor bei nahezu allen Hirnregionen (Ausnahme CG, S und M) eine konstante Steigerung der RD über 9 Monate, die wie in Abbildung 18 (Anhang) sichtbar, des Öfteren auch die RD-Werte der linken unläsionierten Hemisphäre überschreitet. Dieser Effekt

war in den Arealen CG, S und M besonders ausgeprägt. Allgemein erhöht die BoNT-A-Injektion in allen Hirnarealen des M₁-Rezeptors die RD. Ähnlich verhielt sich dieser Effekt auch für den Liganden [³H]-Oxotremorin des M₂-Rezeptors. Auch hier ist eine leichte Zunahme der RD über einen Zeitraum von 9 Monaten sichtbar. Wie bei M₁ wird auch hier ein Anstieg der RD über den Werten der linken Hemisphäre für die Regionen CG und M sichtbar. Im Allgemeinen sind aber für den M₂-Rezeptor die Auswirkungen der BoNT-A-Injektion deutlich geringer als für den M₁-Rezeptor (Abb. 19 Anhang). Der Antagonist [³H]-AF-DX 384 des Rezeptors zeigt ebenfalls eine zeitlich abhängige Zunahme der RD über 9 Monate in allen Hirnarealen, die auch hier in den kortikalen Arealen die Werte der linken Hemisphäre übersteigen (Abb. 20 Anhang). Der M₃-Rezeptor zeigt ähnliche Ergebnisse wie der Agonist von M₂. Für die meisten Areale sind leichte Zunahmen der RD zu verzeichnen. Besonders ausgeprägte Steigerungen der RD, die auch hier die kontralateralen Werte übersteigen, sind in M, S, SN, CG und GP zu verzeichnen (Abb. 21 Anhang). Demnach hebt eine Injektion von BoNT-A den Läsionseffekt im Striatum für alle M-Rezeptoren zumindest teilweise auf.

In diesem Zusammenhang muss diskutiert werden, wie der neurodestruktive Effekt infolge BoNT-A-Applikation mit dem hier festgestellten Wiederanstieg der RD im Zusammenhang steht. Eine zentrale Bedeutung in der Aufklärung dieser Ergebnisse kommt dabei den bereits beschriebenen pathophysiologischen Veränderungen im Striatum mit Entwicklung eines hypercholinergen Ungleichgewichts infolge dopaminerger Deafferenzierung auf Transmitterebene zu. In einem Hirnareal, für das nach neuronaler Deafferenzierung und dopaminerger Entkopplung eine enthemmte und übermäßige Freisetzung von ACh beschrieben ist, kann eine antagonistischen-/agonisteninduzierte Rezeptor-Downregulation angenommen werden, zumal dieser pharmakodynamische Mechanismus weithin beschrieben ist (DeBoer et al., 1993; Rakovska et al., 2003; Spehlmann and Stahl, 1976). Fryer et al. postulieren dazu eine mögliche Interaktion von BoNT-A mit diversen Proteinen und Signalwegen der mACh-Rezeptorsubtypen, die einen Anstieg der RD bewirken können (Fryer et al., 2012). BoNT-A könnte hier über eine Hemmung der Freisetzung von ACh aus neuronalen Strukturen des Striatums ansetzen und unter konsekutiver Abnahme der ACh-Konzentration einer Rezeptor-Downregulation entgegenwirken.

Ein besonderes Augenmerk gilt auch den striatalen Interneuronen, die trotz ihres geringen Anteils von nur 1-2% der Gesamtneuronenzahl im Striatum, maßgeblich an der hohen striatalen ACh-Konzentration beteiligt sind. Wie bereits erwähnt, nutzt BoNT-A das Protein SV2, welches zur Aufnahme des Toxins in die Nervenzelle benötigt wird. Der Subtyp C

dieses Proteins soll nach Brosig im Striatum u.a. auf CIN, nicht aber auf GABAergen Interneuronen exprimiert sein. Demnach stellt das Vorhandensein von SV2C auf den maßgeblich an der Acetylcholinhomöostase beteiligten CIN des Striatums einen idealen Angriffspunkt für BoNT-A dar (Brosig, 2014). Die Vorstellung einer damit verbundenen Abnahme der Ach-Konzentration und konsekutiver Hochregulation von mACh-Rezeptoren erscheint demnach eine plausible Erklärung. Bestätigung könnte diese Annahme in einer von unserer Arbeitsgruppe bereits publizierten Untersuchung an ebenfalls mit BoNT-A – hemiläsionierten Ratten finden (Antipova et al., 2017; Wree et al., 2011).

Weiterhin zeigen Autoren in Versuchen mit BoNT-A zur Interaktion mit mACh-Rezeptoren Schwellungen in Bereich der synaptischen Terminale, die als Verlust zytoskelettaler Integrität gesehen wurden (Berliocchi et al., 2005). Derartige Auftreibungen in den Nervenzellen konnten auch von Antipova et al. beschrieben werden, allerdings ohne Hinweise auf neuronale Schäden oder einen Zelltod infolge von BoNT-A, die zudem später mit weiteren Ergebnissen von Antipova und Mehlan et al. widerlegt wurden (Antipova et al., 2013; Mehlan et al., 2016). Das in diesem komplexen Zusammenhang neben mACh-Rezeptor auch Rezeptoren anderer Transmittersysteme wie z.B. D1 und D2 involviert sind, zeigt auch eine kürzlich publizierte Arbeit. So führt BoNT-A über die Reduktion pathologisch erhöhter Rezeptoren vom Subtyp D2 im Hemiparkinson-Modell der Ratte zur Normalisierung der RD auf Kontrollniveau und damit zu einer Verbesserung der motorischen Eigenschaften der Versuchstiere in Verhaltensuntersuchungen (Wedekind et al., 2018).

Das differentielle Ergebnis von striataler BoNT-A Anwendung auf Ach-RD kann interpretiert werden als weiterer Hinweis darauf, dass die Dichten von mACh-Rezeptoren durch die Verfügbarkeit ihrer Transmitter reguliert werden (Hefco et al., 2004; Sivam et al., 1983). Quantifizierung der RD von mACh- und nACh-Rezeptoren liefern Hinweise darauf, dass die cholinerge Übertragung eine signifikante Auswirkung auf die klinischen Symptome, die mit der Dopamin-Depletion verbunden sind, hat (Lindfors and Ungerstedt, 1990). Mit Blick auf eine zukünftige weiterführende Erprobung ist zudem hervorzuheben, dass bisher keine zentralen oder peripheren Nebenwirkungen bei der intrazerebralen Anwendung von BoNT-A beobachtet werden konnten (Antipova et al., 2017; Wedekind et al., 2018; Wree et al., 2011).

4.5 Rezeptordichten der LB Ratten für glutamerge Rezeptoren

Für alle drei Rezeptoren wurden keine signifikanten Veränderungen festgestellt.

Kainat-Rezeptor

Auf die einzelnen Hirnareale bezogen fand man für den Kainat-Rezeptor für nahezu alle Hirnareale einen Anstieg der RD, der sich nach 9 Monaten wieder den kontralateralen Werten annähert. Ausnahmen waren die Areale S und M, in denen der positive Effekt des BoNT-A zu Beginn (3 Monate) stärker sichtbar war und sich über 9 Monate Überlebenszeit der Ratten wieder reduzierte (Abb. 22 Anhang). Es zeigt sich, dass BoNT-A den 6-OHDA bedingten leichten Anstieg der Kainat-Rezeptoren mit der Zeit teilweise aufhebt. Scheinbar führte BoNT-A damit zu einer Normalisierung der RD in nicht-dopaminergen Strukturen, da die dopaminergen Terminale im Hemiparkinson nicht mehr existieren. Zudem kann die Herunterregulierung des Rezeptors durch BoNT-A im 6-OHDA-geschädigten Rattenhirn eine kompensatorische Reaktion auf überaktive glutamerge Inputs nach nigrostriataler Dopamin-Denervierung sein. Genaue Ursachen für die Interaktion des BoNT-A mit Kainat sind bislang in der Literatur nicht beschrieben. Diese Arbeit zeigt lediglich, dass BoNT-A einen positiven Effekt auf die RD hat, der sich möglicherweise auch auf motorische Symptome MP-Erkrankter (Lern- und Gedächtnisprozesse) äußern kann.

Für diesen Rezeptor liegen nach aktuellem Kenntnisstand keine vergleichbaren Arbeiten vor, die sich mit therapeutisch bedingten Veränderungen, durch L-Dopa, BoNT-A, Acetylcholinesterasehemmer oder ähnlichem beschäftigen.

mGlu 2/3-Rezeptor

Für den mGlu 2/3-Rezeptor sind Unterschiede in der Reaktion der einzelnen Hirnareale auf die Applikation von BoNT-A erkennbar. So sieht man für die Regionen S, CA1 und CA3 eine anhaltende Verbesserung der RD in Richtung Kontrollwerte über die gesamten 9 Monate. Dagegen sinken die positiven Auswirkungen des BoNT-A über die Zeit von 9 Monaten in allen anderen Arealen (Abb. 23 Anhang).

Wie genau BoNT-A nun die Veränderung der RD bewirkt, lässt sich auch hier nach aktuellem Wissenstand nicht genau sagen. In dieser Arbeit wird lediglich gezeigt, dass BoNT-A unterschiedliche positive Wirkungen auf die einzelnen Hirnareale hat, die insgesamt auch hier das Krankheitsbild des MP positiv beeinflussen können. Es besteht auch hier der Verdacht, dass BoNT-A im 6-OHDA-geschädigten Rattenhirn den Rezeptor als eine kompensatorische Reaktion auf die überaktiven glutamergen Inputs nach nigrostriataler Dopamin-Denervierung herunterreguliert.

Einen therapeutischen Ansatz für die metabotropen Rezeptor beschreiben u.a. Johnson et al. (Johnson et al., 2009). Sie postulieren, dass die aktivierten, präsynaptisch exprimierten mGlu 2-Rezeptoren an kortikostriatalen Synapsen die Aktivität des indirekten Signalweges reduzieren und dadurch möglicherweise die motorischen Defizite umkehren können. Interessanterweise ist die Wirksamkeit von LY 379/268 (Antagonist) bei der Verringerung der kortikostriatalen Übertragung in 6-OHDA-läsionierten Ratten erhöht und dieser Effekt wird durch eine chronische L-Dopa-Verabreichung aufgehoben. mGlu 3-Rezeptoren werden präsynaptisch an mehreren Synapsen innerhalb der Basalganglien exprimiert, was darauf hindeutet, dass ihre Aktivierung die Übertragung an diesen Synapsen modulieren kann. Befunde legen nahe, dass die Aktivierung eines oder mehrerer mGlu 3-Rezeptoren die motorischen Symptome von MP lindern kann, indem entweder die Gesamtaktivität des indirekten Weges oder die STN-Aktivität direkt reduziert wird (Johnson et al., 2009).

NMDA-Rezeptor

Der NMDA-Rezeptor zeigt unterschiedliche Reaktionen des BoNT-A auf die RD für die einzelnen Hirnareale. In allen Regionen ist eine positive Veränderung der RD in Richtung der Werte der linken Hemisphäre erkennbar. So ist für die Areale CPu, S und M eine konstante Verbesserung über 9 Monate festzustellen. In den übrigen Arealen sieht man in den ersten 6 Monaten eine anhaltende Verbesserung der RD. Ab dem 9. Monat verliert sich dann dort die Wirkung des BoNT-A (Abb. 24 Anhang).

Wie genau BoNT-A nun die Veränderung der RD bewirkt, lässt sich auch hier nach aktuellem Wissenstand nicht genau sagen. Johnson et al. beschrieben, dass Antagonisten des Rezeptors Antiparkinson-Wirkungen über die Reduktion der Ach-Freisetzung aus striatalen cholinergen Interneuronen, die wiederum die Glutamat-Freisetzung regulieren, zeigen können. Da auch BoNT-A dem striatalen Hypercholinismus entgegenwirkt, wäre der Effekt ähnlich und die RD könnte über die Regulierung der Transmitter-Freisetzung des Ach bestimmt werden (Johnson et al., 2009).

Vergleichende Therapien mit z.B. L-Dopa-Behandlung erhöhte die spezifische Bindung von NMDA-Rezeptoren in den Basalganglien (mittels Autoradiographie an MPTP Affen mit den NMDA-Ligand RO 25 6981 und den mGlu 2/3-Ligand LY 341495) (Jourdain et al., 2015).

Dass speziell auch die NMDA-Rezeptor-Antagonisten ebenfalls Antiparkinson Wirkung haben, wird nach Direktstelleninfusionen in mehrere Basalganglienkerne von Nagern

einschließlich des Striatum und SNpr beobachtet. So wird darauf hingedeutet, dass die Blockierung der NMDA-Rezeptor-Aktivität im Striatum, im indirekten Signalweg und in den Ausgangskernen der Basalganglien alle zu den Antiparkinsonwirkungen bei MP beitragen können (Johnson et al., 2009).

He et al. fanden in seinen Studien des MP-Tiermodell mit MPTP heraus, dass das Toxin zu keiner Veränderungen führte, aber die Verabreichung von L-Dopa entweder an nicht-läsionierte oder 1-MPTP-behandelte Affen zu einer signifikanten Abnahme der [³H]-MK-801-Bindung im CPu führte. Die Daten zeigen, dass auch das Therapeutikum L-Dopa eine modulatorische Wirkung auf das striatale glutamerge System ausübt (He et al., 2000).

Auch Dunah et al. haben die Häufigkeit von NMDA-Rezeptor-Untereinheiten im 6-OHDA-Läsionsmodell (MVB) des MP untersucht. Im läsionierten Striatum war die RD im Vergleich zum nicht-läsionierten Striatum auf 68% bzw. 62% verringert. Die chronische Behandlung von läsionierten Ratten mit L-Dopa normalisierte die Veränderungen in der Häufigkeit und Untereinheitszusammensetzung der NMDA-Rezeptoren in striatalen Membranen (Dunah et al., 2000).

4.6 Therapeutisches Potential der intrastriatalen BoNT-A-Injektion

Mit dieser Arbeit konnte das therapeutische Potential einer BoNT-A Applikation weiter erforscht werden. Neben den Effekten im CPu, wie sie u.a. von Antipova, Mehlan und Wree et al. im Apomorphin-induzierten Rotationstest beschrieben wurden, konnten auch Veränderungen nach BoNT-A Applikation in weiteren Hirnarealen der Ratte mittels Rezeptorautoradiographie erforscht werden (Antipova et al., 2013; Mehlan et al., 2016; Wree et al., 2011). Trotz der erkennbaren Verbesserung der RD nach BoNT-A-Injektion (siehe Kapitel 4.4 und 4.5) kann man nur sagen, dass BoNT-A auf die RD in den einzelnen Arealen wirkt. Wie komplex die Wirkung ist, insbesondere auf andere Rezeptoren des ZNS bezogen, lässt diese Promotionsarbeit nur in gewisser Weise errahnen. Auch über dessen genauen molekularen Mechanismen kann zum derzeitigen Zeitpunkt nur spekuliert werden.

Zudem beschreibt Wree et al. (Wree et al., 2011), dass das BoNT-A zur rein symptomatischen Behandlung des MP geeignet ist, aber nicht die Probleme der Demenz und Wesensveränderung, die mit dieser Krankheit in späteren Stadien einhergehen aufhalten kann.

4.7 Evaluierung der Methode

Das 6-OHDA-Hemiparkinson-Modell der Ratte ist eines der am häufigsten verwendeten Tiermodelle zur Veranschaulichung der Parkinson-Symptome. Allerdings lassen sich in diesem Modell nur rein striatale Veränderungen nach 6-OHDA-Injektion sowie BoNT-A-Applikation darstellen. Dies ist der Progressivität zu verschulden, welche besagt, dass Neurotoxin-induzierte Modelle nur offensichtliche Regionen wie die SNpc und das Striatum berücksichtigen, jedoch andere neuronale Systeme des Rattenhirn nicht (VTA, rostrale Region, primär motorische und somatosensorische Kortex sowie nicht dopaminerge Neuronen SNpc). Grund dafür ist die begrenzte Fähigkeit des 6-OHDA nur dopaminerge und noradrenerge Neurone zu degenerieren (Ungerstedt, 1968). Diese Arten von Neurone sind besonders anfällig für 6-OHDA, da ihre Plasmamembrantransporter eine hohe Affinität für dieses Molekül aufweisen (Luthman et al., 1989). Für diese Arbeit war dieses isolierte Betrachten der Veränderung der RD allerdings vom Vorteil, da man so zunächst die rein Dopamin-induzierte Veränderungen ermitteln und auswerten konnte. Möchte man in weiteren Forschungen auch Auswirkungen auf andere (nicht dopaminerge, aber vom MP betroffene) Areale wie den Nucleus basalis Meynert erhalten, so kann man z.B. das Verfahren mit Ibotensäure verwenden (Kato et al., 1999). Eine weitere Grenze des Modells, besonders im Bezug auf MP, ist das Fehlen der Lewy-Körperchen, die beim menschlichen MP-Erkrankten eine entscheidende Rolle besitzen.

Für die gesamte Forschung wurden 124 Versuchstiere vermessen. Für die Kontrollgruppe wurden für jeden Rezeptor 7 Tiere a 7 Hirnschnitte vermessen. Für die Gruppe LB waren es 33 Tiere a 7 Schnitte und für die Gruppe LV 14 Tiere a 7 Schnitte je Rezeptor. In dieser Arbeit wurden insgesamt 8 verschiedene Rezeptoren ausgewertet. Das ergibt somit 378 Schnittbilder für jeden der 8 Rezeptoren, was für eine angemessene Aussagekraft und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ausreichend war, da die Zahl der Versuchstiere für eben diese Forderungen durch standardisierte Tierversuche reduziert werden konnte (einheitlich endo- und exogene Faktoren in der Haltung).

Wie weiterhin in den Ergebnissen ersichtlich ist, waren die meisten interhemisphärischen Differenzen nicht signifikant. Die dortigen Differenzen (interhemisphärisch und zwischen den Versuchsgruppen) lagen zumeist um 1-3% was für eine gleichmäßige, reproduzierbare Arbeit spricht. Die Methode ist damit valide. Die Erwartungen an den Ergebnissen wurden erfüllt. Es wurde kein signifikanter Einfluss der Injektion einer Vehikellösung gefunden und die Applikation des BoNT-A hatte in den aller meisten Arealen einen positiven Effekt.

4.8 Ausblick

Mit dieser Arbeit konnte ein weiterer Grundstein in der Erforschung der Ursache des MP auf neuronaler Rezeptorebene gelegt werden. So wurde gezeigt, dass die Injektion des 6-OHDA maßgeblich die RD der nACh-Rezeptoren beeinflusst. Auch in den übrigen acetylcholinergen und glutamergen Rezeptoren konnte eine kleine Differenz festgestellt werden, die im direkten und indirekten Zusammenhang mit dem Untergang dopaminerger Neurone steht. Dass die Applikation einer Vehikellösung keine Auswirkungen auf die RD hat, konnte mit der Versuchsgruppe LV bestätigt werden. Weiterhin konnte ein positiver Effekt des BoNT-A auf die RD der läsierten Hemisphäre ausgemacht werden, der sich auch hier besonders stark für den nACh-Rezeptor zeigte. Somit kann der von den Autoren vermutete positive Effekt des BoNT-A auf die motorischen Verhaltensänderungen der Versuchstiere auf Grund einer Veränderung des Rezeptorbesatzes im Ratten-Kortex als mögliche Ursache bestätigt werden.

Es ist vorgesehen, die Versuche auch an weiteren Versuchstieren, u.a. Mäusen fortzuführen, um artspezifische RD-Veränderungen auszuschließen und die Ergebnisse später auf dem Menschen übertragen zu können. Zudem ist es auch sinnvoll, andere Tiermodelle zu verwenden, die sich nicht ausschließlich auf dem Untergang dopaminerger Neurone im nigrostriatalen Trakt beschränken. In diesem Zusammenhang wäre auch eine Applikation eines Blut-Hirn-Schranke-gängigen Acetylcholinesteraseblockers denkbar (wie von einigen Autoren verwendet), der auch den cholinergen Mechanismus im Zusammenhang mit BoNT-A weiter beschreiben könnte. Daran sollte sich dann eine Forschungsreihe mit dem Primatenmodell für MP anschließen.

Ebenfalls von Interesse sind andere Neurotransmitter-Rezeptoren. Um die Rezeptor-vermittelte BoNT-A Wirkung umfassend zu charakterisieren, benötigt man neben den Veränderungen von Glutamat- und ACh-Rezeptoren auch die Veränderungen in den RD weiterer Rezeptoren, wie z.B. Dopamin, Noradrenalin und Serotonin und GABA-Rezeptoren. Auch die Untersuchung der intrastriatalen BoNT-A-Behandlung in genetisch modifizierten Mäuselinien, welche spontan ein parkinsonähnliches Syndrom aufgrund fortschreitender Neurodegeneration ausbilden, wäre von Interesse.

5. Zusammenfassung

Bisher sind wenig Kenntnisse über die Entstehung des idiopathischen Morbus Parkinson, besonders auf neurologischer Rezeptor-Ebene, bekannt. Mit einer Inzidenz von bis zu 100.000 Neuerkrankungen pro Jahr ist Morbus Parkinson eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen unserer Zivilisation. Für die häufigste Therapie mit Levodopa besteht immer noch die Problematik schwerwiegender langfristiger Nebenwirkungen mit der Entwicklung von Wirkungsfluktuationen und Levodopa induzierten Dyskinesen. Auch andere Therapien behandeln lediglich die Symptome. Ein von uns experimentell entwickelter Therapieansatz mit Botulinum-Neurotoxin-A stellt die Frage, ob dieses Neurotoxin den pathologischen Hypercholinismus bei Morbus Parkinson entgegenwirken kann und so eine potentielle neue Therapieform darstellt. Dafür ist es aber zunächst äußerst wichtig, weitere Fortschritte im Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankung zu erzielen und die Ursachen der Erkrankung auf neurologischer Rezeptorebene zu untersuchen.

Mit der vorliegende Arbeit sollen die Veränderungen der Rezeptordichten für Acetylcholin und Glutamat-Rezeptoren nach intrazerebral applizierten BoNT-A und sham-BoNT im Hemiparkinson-Modell der Ratte untersucht werden. Dazu erfolgt unter Verwendung der graphischen Analysesoftware MCID™ Analysis die Auswertung autoradiographisch erfasster Hirnareale im Rattenhirn. Die entsprechenden Injektionsexperimente und die Erstellung der Autoradiogramme unter Nutzung der Radioliganden [³H]-Epibatidin (nAch), [³H]-Pirenzipin (M₁), [³H]-Oxotremorin (M₂, Agonist), [³H]-AF-DX 384 (M₂, Antagonist), [³H]-4-Damp (M₃), [³H]-Kainat (Kainat), [³H]-LY 341/496 (mGlu 2/3) und [³H]-MK 801 (NMDA) erfolgten dabei im Vorfeld dieser Promotionsarbeit von den Mitarbeiter/Innen des Institutes für Neurowissenschaften und Medizin am Forschungszentrum Jülich und am Institut für Anatomie der Universitätsmedizin Rostock.

Mit dieser Dissertation sollte explizit ermittelt werden, ob eine unilaterale Injektion von 6-Hydroxydopamin in das rechte mediale Vorderhinbündel der Ratte die autoradiographisch mit entsprechenden Liganden gemessene ipsilaterale Rezeptordichte striataler Acetylcholin- und Glutamat-Rezeptoren verändert. Dazu sollte untersucht werden, ob die operative, intrazerebrale Applikation einer Vehikellösung (sham-Botulinum-Neurotoxin) Auswirkungen auf die Veränderung der Rezeptordichte der Hemiparkinson-Ratten hat. Zuletzt, im Hinblick auf eine mögliche Therapieoption muss geklärt werden, ob die aufeinander folgende Injektion von 6-Hydroxydopamin in das rechte mediale Vorderhirnbündel und Botulinum-Neurotoxin-

A in das rechte Striatum die Rezeptordichte der striatalen Rezeptoren moduliert und ob hierbei zeitliche Veränderungen (über einen Zeitraum von 9 Monate) erkennbar sind.

Die Injektion der Vehikellösung ergab für alle hier verwendeten Rezeptoren keine Auswirkungen auf die Dichtewerte. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass alle Veränderungen auf Rezeptor-Ebene auf die Wirkung des Toxins zurückzuführen sind. Die Injektion des Toxins bewirkte für die nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren eine signifikante Verringerung der Dichte, insbesondere im Caudatus-Putamen-Komplex und im Nucleus accumbens. Für die Muskarin-Rezeptoren wurden ähnliche, nicht signifikante Ergebnisse ermittelt. Im Kainat-Rezeptor wurde nur für die kortikalen Arealen eine nicht signifikante Steigerung der Rezeptordichten gefunden. Ähnlich verhielt sich dies auch für die metabotropen Glutamat-Rezeptor 2 und 3 und für den NMDA-Rezeptor.

Im Hemiparkinson-Modell konnte nach Therapie mit Botulinum-Neurotoxin-A eine teils signifikante Verbesserung der Rezeptordichten für die Acetylcholin-Rezeptoren ermittelt werden. Das betrifft hier besonders den Caudatus-Putamen-Komplex und den Nucleus accumbens des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors. Dabei ist für alle Areale beim nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor direkt zu Beginn ein starker Effekt des Botulinum-Neurotoxin-A zu verzeichnen, während bei den Muskarin-Rezeptoren ein zeitlich abhängiger Anstieg in den Regionen ermittelt wurde. Die Auswirkungen auf die Glutamat-Rezeptoren waren in den Hirnarealen unterschiedlich. So kann man zwar für diese Rezeptoren zusammenfassend sagen, dass Botulinum-Neurotoxin-A immer eine leichte Verbesserung der Rezeptordichte zeigte, diese jedoch teils auch erst nach 9 Monaten auftrat.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen und vervollständigen die Auswirkungen dopaminergischer Depletion infolge der Parkinson-Erkrankung auf die Rezeptordichte in den verschiedenen Hirnarealen des Rattenkortex für unterschiedliche Rezeptoren. Des weiteren verstärken sie die bestehende These, dass eine intrastriatale Applikation von Botulinum-Neurotoxin-A geeignet sein kann, neurologische Veränderungen auf Rezeptor-Ebene abzuschwächen und somit möglicherweise auch die motorischen Symptome des Morbus Parkinson beim Menschen zu therapieren. Eine Wiederholung der Experimente für weitere Rezeptoren und Versuchstiere ist notwendig, um weitere Hinweise auf die komplexen pathophysiologischen Mechanismen auf neurologischer Rezeptorebene zu bekommen und um weiterhin aus den Ergebnissen dieser Arbeiten entscheidende klinisch-therapeutische Konsequenzen mit Folgen für die Therapie des Morbus Parkinson ziehen zu können.

6. Literaturverzeichnis

Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. B., and Starke, K. (2013). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 11. Auflag. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.

Amalric, M. (2015). Targeting metabotropic glutamate receptors (mGluRs) in Parkinson's disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* 20, 29–34. doi:10.1016/J.COPH.2014.11.001.

Antipova, V. A., Holzmann, C., Schmitt, O., Wree, A., and Hawlitschka, A. (2017). Botulinum Neurotoxin A Injected Ipsilaterally or Contralaterally into the Striatum in the Rat 6-OHDA Model of Unilateral Parkinson's Disease Differently Affects Behavior. *Front. Behav. Neurosci.* 11, 119. doi:10.3389/fnbeh.2017.00119.

Antipova, V., Hawlitschka, A., Mix, E., Schmitt, O., Dräger, D., Benecke, R., et al. (2013). Behavioral and structural effects of unilateral intrastratial injections of botulinum neurotoxin a in the rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Res.* 91, 838–847. doi:10.1002/jnr.23210.

Antonucci, F., Rossi, C., Gianfranceschi, L., Rossetto, O., and Caleo, M. (2008). Long-Distance Retrograde Effects of Botulinum Neurotoxin A. *J. Neurosci.* 28, 3689 LP-3696. Available at: <http://www.jneurosci.org/content/28/14/3689.abstract>.

Araki, T., Tanji, H., Fujihara, K., Kato, H., Imai, Y., Mizugaki, M., et al. (2000). Sequential changes of cholinergic and dopaminergic receptors in brains after 6-hydroxydopamine lesions of the medial forebrain bundle in rats. *J. Neural Transm.* 107, 873–884. doi:10.1007/s007020070039.

Aubert, I., Araujo, D. M., Cécyre, D., Robitaille, Y., Gauthier, S., and Quirion, R. (1992). Comparative Alterations of Nicotinic and Muscarinic Binding Sites in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *J. Neurochem.* 58, 529–541. doi:10.1111/j.1471-4159.1992.tb09752.x.

Aumüller, G., Aust, G., Conrad, A., Engele, J., and Kirsch, J. (2017). *Duale Reihe Anatomie*. 4. Auflage. Thieme.

Bajjalieh, S. M., Peterson, K., Linial, M., and Scheller, R. H. (1993). Brain contains two forms of synaptic vesicle protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 2150–4. doi:10.1073/pnas.90.6.2150.

Bauer, A., Zilles, K., Matusch, A., Holzmann, C., Riess, O., and Von Hörsten, S. (2005). Regional and subtype selective changes of neurotransmitter receptor density in a rat transgenic for the Huntington's disease mutation. *J. Neurochem.* 94, 639–650. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03169.x.

Bayer, S. A., Altman, J., Russo, R. J., and Zhang, X. (1993). Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology* 14, 83–144.

Belleruche, J., Kilpatrick, I. C., Birdsall, N. J. M., and Hulme, E. (1982). Presynaptic muscarinic receptors on dopaminergic terminals in nucleus accumbens. doi:10.1016/0006-8993(82)90873-3.

Benarroch, E. E. (2012). Effects of acetylcholine in the striatum. *Neurology* 79, 274–281. doi:10.1212/WNL.0b013e31825fe154.

Berg, C. (2013). Botulinumtoxin - Profikarriere eines Neurotoxins. *Pharm. Ztg.* Available at: <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=48601>.

Literaturverzeichnis

- Berliocchi, L., Fava, E., Leist, M., Horvat, V., Dinsdale, D., Read, D., et al. (2005). Botulinum neurotoxin C initiates two different programs for neurite degeneration and neuronal apoptosis. *J. Cell Biol.* 168, 607–618. doi:10.1083/jcb.200406126.
- Bernard, V., Gardiol, A., Faucheux, B., Bloch, B., Agid, Y., and Hirsch, E. (1996). Expression of glutamate receptors in the human and rat basal ganglia: Effect of the dopaminergic denervation on AMPA receptor gene expression in the striatopallidal complex in parkinson's disease and rat with 6-OHDA lesion. *J. Comp. Neurol.* 368, 553–568. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960513)368:4<553::AID-CNE7>3.0.CO;2-3.
- Betarbet, R., Poisik, O., Sherer, T. B., and Greenamyre, J. T. (2004). Differential expression and ser897 phosphorylation of striatal N-methyl-d-aspartate receptor subunit NR1 in animal models of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 187, 76–85. doi:10.1016/j.EXPNEUROL.2003.12.012.
- Bhat, R. V., Turner, S. L., Marks, M. J., and Collins, A. C. (1990). Selective changes in sensitivity to cholinergic agonists and receptor changes elicited by continuous physostigmine infusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255, 187 LP-196. Available at: <http://jpet.aspetjournals.org/content/255/1/187.abstract>.
- Bigalke, H., Dreyer, F., and Bergey, G. (1985). Botulinum a neurotoxin inhibits non-cholinergic synaptic transmission in mouse spinal cord neurons in culture. *Brain Res.* 360, 318–324. doi:10.1016/0006-8993(85)91248-X.
- Birdsall, N. J. M., Burgen, A. S. V., and Hulme, E. C. (1978). The Binding of Agonists to Brain Muscarinic Receptors. *Mol. Pharmacol.* 14, 723–736. Available at: <http://molpharm.aspetjournals.org/content/14/5/723>.
- Blandini, F., and Armentero, M.-T. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J.* 279, 1156–1166. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08491.x.
- Blandini, F., Porter, R. H. P., and Greenamyre, J. T. (1996). Glutamate and Parkinson's disease. *Mol. Neurobiol.* 12, 73–94. doi:10.1007/BF02740748.
- Bleakman, D., Gates, M. R., and Mackowiak, A. M. O. and M. (2002). Kainate Receptor Agonists, Antagonists and Allosteric Modulators. *Curr. Pharm. Des.* 8, 873–885. doi:<http://dx.doi.org/10.2174/1381612024607108>.
- Bledsoe, I. O., and Comella, C. L. (2016). Botulinum Toxin Treatment of Cervical Dystonia. *Semin. Neurol. Thieme*, 047–053. doi:10.1055/s-0035-1571210.
- Boorman, J. P. B., GrootKormelink, P. J., and Sivilotti, L. G. (2000). Stoichiometry of human recombinant neuronal nicotinic receptors containing the $\beta 3$ subunit expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 529, 565–577. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00565.x.
- Bordia, T., Grady, S. R., McIntosh, J. M., and Quik, M. (2007). Nigrostriatal Damage Preferentially Decreases a Subpopulation of $\alpha 6\beta 2^*$ nAChRs in Mouse, Monkey, and Parkinson's Disease Striatum. *Mol. Pharmacol.* 72, 52–61. doi:10.1124/mol.107.035998.
- Braak, H., Tredici, K. Del, Rüb, U., de Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., and Braak, E. (2003). Staging of Brain Pathology Related to Sporadic Parkinson's Disease Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 4580, 197–211. doi:10.1016/S0197-4580(02)00065-9.
- Brosig, H. (2014). Botulinum-Neurotoxin A-induzierte Varikositäten im Caudatus putamen der Ratte: eine quantitative Meinen Eltern, Geschwistern.

Literaturverzeichnis

- Buckley, N. J., Bonner, T. I., and Brann, M. R. (1988). Localization of a family of muscarinic receptor mRNAs in rat brain. *J. Neurosci.* 8, 4646–4652. doi:10.1523/JNEUROSCI.08-12-04646.1988.
- Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Pisani, A., and Bernardi, G. (1998). Blockade of M2-like muscarinic receptors enhances long-term potentiation at corticostriatal synapses. *Eur. J. Neurosci.* 10, 3020–3023. doi:10.1111/j.1460-9568.1998.00348.x.
- Clarke, P., and Pert, A. (1985). Autoradiographic evidence for nicotine receptors on nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic neurons. *Brain Res.* 348, 355–358. doi:https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90456-1.
- Colquhoun, D., Unwin, N., Shelley, C., Hatton, C., and Sivilotti, L. (2003). Nicotinic acetylcholine receptors. *Burger's Med. Chem. Vol II Drug Discov. Drug Dev.* 2, 357–405. doi:10.1517/14728220902841045.
- Comella, C. L. (2018). Systematic review of botulinum toxin treatment for oromandibular dystonia. *Toxicon.* doi:10.1016/j.toxicon.2018.02.006.
- Cooper, E., Couturier, S., and Ballivet, M. (1991). Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* 350, 235–238.
- Cremer, J. N., Amunts, K., Graw, J., Piel, M., Rösch, F., and Zilles, K. (2015). Neurotransmitter receptor density changes in Pitx3ak mice – A model relevant to Parkinson's disease. *Neuroscience* 285, 11–23. doi:https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.10.050.
- Dajas-Bailador, F., and Wonnacott, S. (2004). Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 317–324. doi:10.1016/J.TIPS.2004.04.006.
- Dawson, T. M., Dawson, V. L., Gage, F. H., Fisher, L. J., Hunt, M. A., and Wamsley, J. K. (1991). Downregulation of muscarinic receptors in the rat caudate-putamen after lesioning of the ipsilateral nigrostriatal dopamine pathway with 6-hydroxydopamine (6-OHDA): normalization by fetal mesencephalic transplants. *Brain Res.* 540, 145–152. doi:10.1016/0006-8993(91)90501-L.
- de Klippel, N., Sarre, S., Ebinger, G., and Michotte, Y. (1993). Effect of M1- and M2-muscarinic drugs on striatal dopamine release and metabolism: an in vivo microdialysis study comparing normal and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Brain Res.* 630, 57–64. doi:10.1016/0006-8993(93)90642-Z.
- DeBoer, P., Abercrombie, E. D., Heeringa, M., and Westerink, B. H. C. (1993). differential effect of systemic administration of bromocriptine and DOPA on the release of acetylcholine from striatum of intact and 6-OHDA-treated rats. *Brain Res.* 608, 198–203. doi:https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91459-6.
- Dickerson, T. J., and Janda, K. D. (2006). The Use of Small Molecules to Investigate Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets for Treatment of Botulinum Neurotoxin A Intoxication. *ACS Chem. Biol.* 1, 359–369. doi:10.1021/cb600179d.
- Dong, M., Yeh, F., Tepp, W. H., Dean, C., Johnson, E. A., Janz, R., et al. (2006). SV2 Is the Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin A. *Science* (80-.). 312, 592 LP-596. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/312/5773/592.abstract>.
- Dunah, A. W., Wang, Y., Yasuda, R. P., Kameyama, K., Haganir, R. L., Wolfe, B. B., et al. (2000). Alterations in Subunit Expression, Composition, and Phosphorylation of Striatal N-Methyl-D-Aspartate Glutamate Receptors in a Rat 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease. *Mol. Pharmacol.* 57, 342 LP-352. Available at:

Literaturverzeichnis

<http://molpharm.aspetjournals.org/content/57/2/342.abstract>.

- Durany, N., Zöchling, R., Boissl, K. W., Paulus, W., Ransmayr, G., Tatschner, T., et al. (2000). Human post-mortem striatal $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor density in schizophrenia and Parkinson's syndrome. *Neurosci. Lett.* 287, 109–112. doi:10.1016/S0304-3940(00)01144-7.
- Duty, S., and Jenner, P. (2011). Animal models of Parkinson's disease: A source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br. J. Pharmacol.* 164, 1357–1391. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01426.x.
- Frick, C., Richtsfeld, M., Sahani, N., Kaneki, P., and Blobner, M. (2007). Long-term Effects of Botulinum Toxin on Neuromuscular Function. *Anesthesiology* 106, 1139–1146. Available at: <http://dx.doi.org/10.1097/01.anes.0000267597.65120.16>.
- Fryer, A. D., Christopoulos, A., and Nathanson, N. M. (2012). *Muscarinic Receptors*. Volume 208. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Gan, J., Qi, C., Mao, L.-M., and Liu, Z. (2014). Changes in surface expression of N-methyl-D-aspartate receptors in the striatum in a rat model of Parkinson's disease. *Drug Des. Devel. Ther.* 8, 165–173. doi:10.2147/DDDT.S51559.
- Gerlach, M., Gsell, W., Kornhuber, J., Jellinger, K., Krieger, V., Pantucek, F., et al. (1996). A post mortem study on neurochemical markers of dopaminergic, GABA-ergic and glutamatergic neurons in basal ganglia-thalamocortical circuits in Parkinson syndrome. *Brain Res.* 741, 142–152. doi:[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)00915-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)00915-8).
- Gerlach, M., Mehler-Wex, C., Walitza, S., Warnke, A., and Wewetzer, C. (2016). *Neuro-/Psychopharmaka im Kindes- und Jugendalter: Grundlagen und Therapie*. Heidelberg Berlin: Springer Berlin Heidelberg.
- Gerlach, M., Reichmann, H., and Riederer, P. (2003). *Die Parkinson-Krankheit*. Wien: Springer.
- Ghose, S., Crook, J. M., Bartus, C. L., Sherman, T. G., Herman, M. M., Hyde, T. M., et al. (2008). Metabotropic glutamate receptor 2 and 3 gene expression in the human prefrontal cortex and mesencephalon in schizophrenia. *Int. J. Neurosci.* 118, 1609–1627. doi:10.1080/00207450802330702.
- Giraldo, E., Hammer, R., and Ladinsky, H. (1987). *Distribution of muscarinic receptor subtypes in rat brain as determined in binding studies with AF-DX 116 and pirenzepine*. doi:10.1016/0024-3205(87)90031-2.
- Gotti, C., Clementi, F., Fornari, A., Gaimarri, A., Guiducci, S., Manfredi, I., et al. (2009). Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochem. Pharmacol.* 78, 703–711. doi:10.1016/J.BCP.2009.05.024.
- Gubellini, P., and Kachidian, P. (2015). *Animal models of Parkinson's disease: An updated overview*. doi:10.1016/j.neurol.2015.07.011.
- Gupta, A. D., and Visvanathan, R. (2016). Botulinum toxin for foot dystonia in patients with Parkinson's disease having deep brain stimulation: A Case series and a pilot study. *J. Rehabil. Med.* 48, 559–562. doi:10.2340/16501977-2094.
- Haghir, H., Kovac, S., Speckmann, E.-J., Zilles, K., and Gorji, A. (2009). Patterns of neurotransmitter receptor distributions following cortical spreading depression. *Neuroscience* 163, 1340–1352. doi:10.1016/J.NEUROSCIENCE.2009.07.067.

Literaturverzeichnis

- Hamouda, A. K., Jin, X., Sanghvi, M., Srivastava, S., Pandhare, A., Duddempudi, P. K., et al. (2009). Photoaffinity Labeling the Agonist Binding Domain of $\alpha 4\beta 4$ and $\alpha 4\beta 2$ Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors with [(125)I]Epibatidine and 5[(125)I]A-85380. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 1987–1995. doi:10.1016/j.bbame.2009.06.012.
- Happe, H. K., Peters, J. L., Bergman, D. A., and Murrin, L. C. (1994). Localization of nicotinic cholinergic receptors in rat brain: Autoradiographic studies with [3H]cytisine. *Neuroscience* 62, 929–944. doi:https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90484-7.
- Härfstrand, A., Fuxe, K., Andersson, K., Agnati, L., Janson, A. M., and Nordberg, A. (1987). Partial di-mesencephalic hemitranssections produce disappearance of [3H]nicotine binding in discrete regions of rat brain. *Acta Physiol. Scand.* 130, 161–163. doi:10.1111/j.1748-1716.1987.tb08122.x.
- Harrison, I. F., Anis, H. K., and Dexter, D. T. (2016). Associated degeneration of ventral tegmental area dopaminergic neurons in the rat nigrostriatal lactacystin model of parkinsonism and their neuroprotection by valproate. *Neurosci. Lett.* 614, 16–23. doi:10.1016/j.neulet.2015.12.052.
- Hawkes, C., Del Tredici, K., and Braak, H. (2009). Parkinson's Disease: The Dual Hit Theory Revisited. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1170, 615–622.
- Hawkes, C. H., Del Tredici, K., and Braak, H. (2007). Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33, 599–614. doi:10.1111/j.1365-2990.2007.00874.x.
- Hawkes, C. H., and Shephard, B. C. (1998). Olfactory Evoked Responses and Identification Tests in Neurological Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 855, 608–615. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb10631.x.
- He, L., Di Monte, D. ., Langston, J. ., and Quik, M. (2000). Autoradiographic analysis of N-methyl-d-aspartate receptor binding in monkey brain: effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and Levodopa treatment. *Neuroscience* 99, 697–704. doi:10.1016/S0306-4522(00)00235-9.
- Hefco, V., Yamada, K., Hefco, A., Hritcu, L., Tiron, A., and Nabeshima, T. (2004). The interaction between the cholinergic and dopaminergic system in learning and memory process in rats. *Rom. J. Physiol. Physiol. Sci.* 41, 21–30. Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/15984653>.
- Hefti, F., Melamed, E., Sahakian, B. J., and Wurtman, R. J. (1980). Circling behavior in rats with partial, unilateral nigro-striatal lesions: Effect of amphetamine, apomorphine, and DOPA. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 12, 185–188. doi:10.1016/0091-3057(80)90353-6.
- Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, L. M., and Villanueva-Olivo, A. (2017). The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurol. (English Ed.)* 32, 533–539. doi:10.1016/J.NRLENG.2015.06.019.
- Hersch, S., Gutekunst, C.-A., Rees, H., Heilman, C., and Levey, A. (1994). *Distribution of m1-m4 muscarinic receptor proteins in the rat striatum: Light and electron microscopic immunocytochemistry using subtype-specific antibodies.* doi:10.1523/JNEUROSCI.14-05-03351.1994.
- Hinghofer-Szalkay, H., and Blumenfeld, H. (2002). Basalganglien-kette: Direkter und indirekter Weg. <http://physiologie.cc/XV.6.htm>.
- Houghtling, R. A., Dávila-García, M. I., and Kellar, K. J. (1995). Characterization of (+/-)-[3H]epibatidine binding to nicotinic cholinergic receptors in rat and human brain. *Mol. Pharmacol.* 48, 280 LP-287. Available at:

Literaturverzeichnis

<http://molpharm.aspetjournals.org/content/48/2/280.abstract>.

- Hsu, A., and Frankel, A. (2017). Modification of chin projection and aesthetics with onabotulinumtoxin A injection. *JAMA Facial Plast. Surg.* 19, 522–527. Available at: <http://dx.doi.org/10.1001/jamafacial.2017.0606>.
- Huettnner, J. E., and Bean, B. P. (1988). Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 1307–1311. Available at: <http://www.pnas.org/content/85/4/1307>.
- Janz, R., and Südhof, T. (1999). SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. *Neuroscience* 94, 1279–1290. doi:10.1016/S0306-4522(99)00370-X.
- Jellinger, K. A. (2009). Formation and development of Lewy pathology: a critical update. *J. Neurol.* 256, 270–279. doi:10.1007/s00415-009-5243-y.
- Jensen, A. A., Frølund, B., Liljefors, T., and Krosgaard-Larsen, P. (2005). Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors: Structural Revelations, Target Identifications, and Therapeutic Inspirations. *J. Med. Chem.* 48, 4705–4745. doi:10.1021/jm040219e.
- Johnson, B. G., Wright, R. A., Arnold, M. B., Wheeler, W. J., Ornstein, P. L., and Schoepp, D. D. (1999). [3H]-LY341495 as a novel antagonist radioligand for group II metabotropic glutamate (mGlu) receptors: characterization of binding to membranes of mGlu receptor subtype expressing cells. *Neuropharmacology* 38, 1519–1529. doi:10.1016/S0028-3908(99)00053-2.
- Johnson, K. A., Conn, P. J., and Niswender, C. M. (2009). Glutamate receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 8, 475–491. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3005251/>.
- Jones, I. W., Bolam, J. P., and Wonnacott, S. (2001). Presynaptic localisation of the nicotinic acetylcholine receptor $\beta 2$ subunit immunoreactivity in rat nigrostriatal dopaminergic neurones. *J. Comp. Neurol.* 439, 235–247. doi:10.1002/cne.1345.
- Jonsson, G. (1980). Chemical Neurotoxins as Denervation Tools in Neurobiology. *Annu. Rev. Neurosci.* 3, 169–187. doi:10.1146/annurev.ne.03.030180.001125.
- Jourdain, V. A., Morin, N., Grégoire, L., Morissette, M., and Di Paolo, T. (2015). Changes in glutamate receptors in dyskinetic parkinsonian monkeys after unilateral subthalamotomy. *J. Neurosurg.* 123, 1–11. doi:10.3171/2014.JNS141570.
- Joyce, J. N. (1991). Differential response of striatal dopamine and muscarinic cholinergic receptor subtypes to the loss of dopamine: I. Effects of intranigral or intracerebroventricular 6-hydroxydopamine lesions of the mesostriatal dopamine system. *Exp. Neurol.* 113, 261–276. doi:https://doi.org/10.1016/0014-4886(91)90016-6.
- Kaiser, S., and Wonnacott, S. (2000). α -Bungarotoxin-Sensitive Nicotinic Receptors Indirectly Modulate [3H]Dopamine Release in Rat Striatal Slices via Glutamate Release. *Mol. Pharmacol.* 58, 312–318. doi:10.1124/mol.58.2.312.
- Kas, A., Bottlaender, M., Gallezot, J. D., Vidailhet, M., Villafane, G., Grégoire, M. C., et al. (2009). Decrease of Nicotinic Receptors in the Nigrostriatal System in Parkinson's Disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 1601–1608. doi:10.1038/jcbfm.2009.74.

Literaturverzeichnis

- Kato, H., Aikawa, H., and Shinohara, Y. (1999). *The effects of lesions in the nucleus basalis of Meynert and physostigmine on art frontal cortex acetylcholine level.*
- Knol, R. J. J., de Bruin, K., Opmeer, B., Voorn, P., Jonker, A. J., van Eck-Smit, B. L. F., et al. (2014). Decreased ipsilateral [123I]iododexetimide binding to cortical muscarinic receptors in unilaterally 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Nucl. Med. Biol.* 41, 90–95. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2013.10.003>.
- Kulak, J. M., McIntosh, J. M., and Quik, M. (2002). Loss of Nicotinic Receptors in Monkey Striatum after 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Treatment Is Due to a Decline in α -Conotoxin MII Sites. *Mol. Pharmacol.* 61, 230–238. doi:[10.1124/mol.61.1.230](https://doi.org/10.1124/mol.61.1.230).
- Laing, T. A., Laing, M. E., and O’Sullivan, S. T. (2008). Botulinum toxin for treatment of glandular hypersecretory disorders. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.* 61, 1024–1028. doi:[10.1016/j.bjps.2008.03.023](https://doi.org/10.1016/j.bjps.2008.03.023).
- Lange, K. W., Wells, F. R., Jenner, P., and Marsden, C. D. (1993). Altered Muscarinic and Nicotinic Receptor Densities in Cortical and Subcortical Brain Regions in Parkinson’s Disease. *J. Neurochem.* 60, 197–203. doi:[10.1111/j.1471-4159.1993.tb05838.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb05838.x).
- Levey, A., Edmunds, S. M., Heilman, C., Desmond, T., and Frey, K. (1994). *Localization of muscarinic M3 receptor protein and M3 receptor binding in rat brain.* doi:[10.1016/0306-4522\(94\)90017-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90017-5).
- Levey, A. I. (1993). Immunological localization of m1–m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sci.* 52, 441–448. doi:[10.1016/0024-3205\(93\)90300-R](https://doi.org/10.1016/0024-3205(93)90300-R).
- Levey, A. I., Kitt, C. A., Simonds, W. F., Price, D. L., and Brann, M. R. (1991). Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J. Neurosci.* 11, 3218–3226. doi:[10.1523/JNEUROSCI.11-10-03218.1991](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-10-03218.1991).
- Lim, S. A. O., Kang, U. J., and McGehee, D. S. (2014). Striatal cholinergic interneuron regulation and circuit effects. *Front. Synaptic Neurosci.* 6, 1–23. doi:[10.3389/fnsyn.2014.00022](https://doi.org/10.3389/fnsyn.2014.00022).
- Lin, Y., and Phillis, J. W. (1991). Muscarinic receptor agonist-mediated modulation of neuronal activity in rat cerebral cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 200, 45–52. doi:[10.1016/0014-2999\(91\)90663-B](https://doi.org/10.1016/0014-2999(91)90663-B).
- Lindfors, N., and Ungerstedt, U. (1990). Bilateral regulation of glutamate tissue and extracellular levels in caudate-putamen by midbrain dopamine neurons. *Neurosci. Lett.* 115, 248–252. doi:[10.1016/0304-3940\(90\)90463-J](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90463-J).
- Liskowsky, D. R., and Potter, L. T. (1985). Muscarine-binding sites localized to cortical dopamine terminals. *Neurosci. Lett.* 58, 229–233. doi:[https://doi.org/10.1016/0304-3940\(85\)90169-7](https://doi.org/10.1016/0304-3940(85)90169-7).
- Luk, K. C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O’Brien, P., Trojanowski, J. Q., et al. (2012). Pathological α -Synuclein Transmission Initiates Parkinson-like Neurodegeneration in Non-transgenic Mice. *Science* 338, 949–953. doi:[10.1126/science.1227157](https://doi.org/10.1126/science.1227157).
- Luthman, J., Fredriksson, A., Sundström, E., Jonsson, G., and Archer, T. (1989). Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav. Brain Res.* 33, 267–277. doi:[https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(89\)80121-4](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(89)80121-4).
- Mailman, R. B. (1983). Lithium-induced polydipsia: Dependence on nigrostriatal dopamine pathway and relationship to

Literaturverzeichnis

- changes in the renin-angiotensin system. *Psychopharmacology (Berl)*. 80, 143–149. doi:10.1007/BF00427958.
- Mann, T., Zilles, K., Klawitter, F., Cremer, M., Hawlitschka, A., Palomero-Gallagher, N., et al. (2018). Acetylcholine Neurotransmitter Receptor Densities in the Striatum of Hemiparkinsonian Rats Following Botulinum Neurotoxin-A Injection. *Front. Neuroanat.* 12, 65. doi:10.3389/fnana.2018.00065.
- Marchi, M., Risso, F., Viola, C., Cavazzani, P., and Raiteri, M. (2002). Direct evidence that release-stimulating $\alpha 7^*$ nicotinic cholinergic receptors are localized on human and rat brain glutamatergic axon terminals. *J. Neurochem.* 80, 1071–1078.
- Marks, M. J., Smith, K. W., and Collins, A. C. (1998). Differential agonist inhibition identifies multiple epibatidine binding sites in mouse brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 377–386.
- Martin, B. R., and Aceto, M. D. (1981). Nicotine binding sites and their localization in the central nervous system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 5, 473–478. doi:10.1016/0149-7634(81)90017-8.
- Mash, D. C., and Potter, L. T. (1986). Autoradiographic localization of M1 and M2 muscarine receptors in the rat brain. *Neuroscience* 19, 551–564. doi:https://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90280-0.
- Matthias, M. (2017). Synaptische Übertragung und Vesikelfreisetzung – Die Physiologie des Nervensystems.
- McBain, C. J., and Mayer, M. L. (1994). N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol. Rev.* 74, 723–760. doi:10.1152/physrev.1994.74.3.723.
- McCormick, D. A., and Prince, D. A. (1987). Acetylcholine causes rapid nicotinic excitation in the medial habenular nucleus of guinea pig, in vitro. *J. Neurosci.* 7, 742–752. doi:10.1523/JNEUROSCI.07-03-00742.1987.
- McOmish, C., Pavey, G., McLean, C., Horne, M., Dean, B., and Scarr, E. (2017). Muscarinic receptor binding changes in postmortem Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 124, 227–236. doi:10.1007/s00702-016-1629-z.
- Mehlan, J., Brosig, H., Schmitt, O., Mix, E., Wree, A., and Hawlitschka, A. (2016). Intrastriatal injection of botulinum neurotoxin-A is not cytotoxic in rat brain – A histological and stereological analysis. *Brain Res.* 1630, 18–24. doi:https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.10.056.
- Meyer, P., Strecker, K., Kendziorra, K., and Al, E. (2009). Reduced $\alpha 4\beta 2^*$ -nicotinic acetylcholine receptor binding and its relationship to mild cognitive and depressive symptoms in parkinson disease. *Arch. Gen. Psychiatry* 66, 866–877. Available at: <http://dx.doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2009.106>.
- Miller, J. H., Gibson, V. A., and McKinney, M. (1991). Binding of [3H]AF-DX 384 to cloned and native muscarinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259, 601 LP-607. Available at: <http://jpet.aspetjournals.org/content/259/2/601.abstract>.
- Mittal, S. O., Machado, D., Richardson, D., Dubey, D., and Jabbari, B. (2017). Botulinum Toxin in Parkinson Disease Tremor: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study With a Customized Injection Approach. *Mayo Clin. Proc.* 92, 1359–1367. doi:10.1016/j.mayocp.2017.06.010.
- Montecucco, C., and Schiavo, G. (1995). Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Q. Rev. Biophys.* 28, 423. doi:10.1017/S0033583500003292.

Literaturverzeichnis

- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., et al. (1992). Heteromeric NMDA Receptors: Molecular and Functional Distinction of Subtypes. *Science* (80-). 256, 1217–1221. doi:10.1126/science.256.5060.1217.
- Müller, K., Mix, E., Adib Saberi, F., Dressler, D., and Benecke, R. (2009). Prevalence of neutralising antibodies in patients treated with botulinum toxin type A for spasticity. *J. Neural Transm.* 116, 579–585. doi:10.1007/s00702-009-0223-z.
- Nash, J. E., and Brotchie, J. M. (2002). Characterisation of striatal NMDA receptors involved in the generation of parkinsonian symptoms: Intrastratial microinjection studies in the 6-OHDA-lesioned rat. *Mov. Disord.* 17, 455–466. doi:10.1002/mds.10107.
- Naumann, M. (2003). *Botulinumtoxin - Wirkprinzip und klinische Anwendung*. Bremen: UNI-MED.
- Nörenberg, P. D. W., Sauermost, R., and Freudig, D. (1999). *Glutamatrezeptor-Kanäle*. Available at: <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/glutamatrezeptor-kanale/28553>.
- Obeso, J., Marin, C., Rodriguez-Oroz, C., Blesa, J., Benitez-Temiño, B., Mena-Segovia, J., et al. (2008a). The basal ganglia in Parkinson's disease: Current concepts and unexplained observations. *Ann. Neurol.* 64. doi:10.1002/ana.21481.
- Obeso, J., Rodríguez-Oroz, M. C., Benitez-Temino, B., Blesa, F. J., Guridi, J., Marin, C., et al. (2008b). Functional organization of the basal ganglia: Therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 23. doi:10.1002/mds.22062.
- Obeso, J., Rodriguez-Oroz, M., Goetz, C., Marin, C., Kordower, J., Díaz, M., et al. (2010). Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat. Med.* 16, 653–661.
- Oertel, W. H., Deuschl, G., and Poewe, W. (2011). *Parkinson-Syndrome und andere Bewegungsstörungen*. 1. Auflage. Stuttgart, Deutschland: Thieme.
- Olanow, C. W., and Prusiner, S. B. (2009). Is Parkinson's disease a prion disorder? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 12571–12572. doi:10.1073/pnas.0906759106.
- Ornstein, P. L., Arnold, M. B., Bieisch, T. J., Wright, R. A., Wheeler, W. J., and Schoepp, D. D. (1998). [3H]LY341495, a highly potent, selective and novel radioligand for labeling group II metabotropic glutamate receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 1919–1922. doi:10.1016/S0960-894X(98)00329-1.
- Pakhotin, P., and Bracci, E. (2007). Cholinergic Interneurons Control the Excitatory Input to the Striatum. *J. Neurosci.* 27, 391–400. doi:10.1523/JNEUROSCI.3709-06.2007.
- Palomero-Gallagher, N., Schleicher, A., Lindemann, S., Lessenich, A., Zilles, K., and Löscher, W. (2008). Receptor fingerprinting the circling ci2 rat mutant: Insights into brain asymmetry and motor control. *Exp. Neurol.* 210, 624–637. doi:https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.12.014.
- Parker, M. J., Beck, A., and Luetje, C. W. (1998). Neuronal Nicotinic Receptor $\beta 2$ and $\beta 4$ Subunits Confer Large Differences in Agonist Binding Affinity. *Mol. Pharmacol.* 54, 1132 LP-1139. Available at: <http://molpharm.aspetjournals.org/content/54/6/1132.abstract>.
- Paterson, D., and Nordberg, A. (2000). Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog. Neurobiol.* 61, 75–111. doi:10.1016/S0301-0082(99)00045-3.

Literaturverzeichnis

- Paxinos, G., and Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - 6th Edition*. San Diego: Academic press.
- Perez, X. A., Bordia, T., McIntosh, J. M., and Quik, M. (2010). $\alpha 6\beta 2^*$ and $\alpha 4\beta 2^*$ Nicotinic Receptors Both Regulate Dopamine Signaling with Increased Nigrostriatal Damage: Relevance to Parkinson's Disease. *Mol. Pharmacol.* 78, 971–980. doi:10.1124/mol.110.067561.
- Picconi, B., Pisani, A., Centonze, D., Battaglia, G., Storto, M., Nicoletti, F., et al. (2002). Striatal metabotropic glutamate receptor function following experimental parkinsonism and chronic levodopa treatment. *Brain* 125, 2635–2645. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awf269>.
- Pienaar, I. S., Harrison, I. F., Elson, J. L., Bury, A., Woll, P., Simon, A. K., et al. (2015). An animal model mimicking pedunculopontine nucleus cholinergic degeneration in Parkinson's disease. *Brain Struct. Funct.* 220, 479–500. doi:10.1007/s00429-013-0669-5.
- Piggott, M. A., Owens, J., O'Brien, J., Colloby, S., Fenwick, J., Wyper, D., et al. (2003). Muscarinic receptors in basal ganglia in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *J. Chem. Neuroanat.* 25, 161–173. doi:10.1016/S0891-0618(03)00002-4.
- Piggott, M., Owens, J., O'Brien, J., Paling, S., Wyper, D., Fenwick, J., et al. (2002). Comparative distribution of binding of the muscarinic receptor ligands pirenzepine, AF-DX 384, (R,R)-I-QNB and (R,S)-I-QNB to human brain. *J. Chem. Neuroanat.* 24, 211–223. doi:[https://doi.org/10.1016/S0891-0618\(02\)00066-2](https://doi.org/10.1016/S0891-0618(02)00066-2).
- Platt, S. R. (2007). The role of glutamate in central nervous system health and disease – A review. *Vet. J.* 173, 278–286. doi:10.1016/J.TVJL.2005.11.007.
- Pradhan, A., Cumming, P., and Clarke, P. (2002). *[125I]Epibatidine-labelled nicotinic receptors in the extended striatum and cerebral cortex: Lack of association with serotonergic afferents*. doi:10.1016/S0006-8993(02)03340-1.
- Quik, M., Bordia, T., Huang, L., and Perez, X. (2011). Targeting Nicotinic Receptors for Parkinson's Disease Therapy. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 10, 651–658.
- Rakovska, A., Javitt, D., Raichev, P., Ang, R., Balla, A., Aspromonte, J., et al. (2003). Physiological release of striatal acetylcholine (in vivo): effect of somatostatin on dopaminergic–cholinergic interaction. *Brain Res. Bull.* 61, 529–536. doi:[https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(03\)00192-8](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(03)00192-8).
- Ramirez-Latorre, J., Yu, C. R., Qu, X., Perin, F., Karlin, A., and Role, L. (1996). Functional contribution of $\gamma 5$ subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature* 380, 347–351.
- Ringdahl, B., and Jenden, D. J. (1983). Pharmacological properties of oxotremorine and its analogs. *Life Sci.* 32, 2401–2413. doi:10.1016/0024-3205(83)90365-X.
- Rinne, J. O., Paljärvi, L., Rummukainen, J., Röyttä, M., and Rinne, U. K. (1990). “Neuronal Loss in the Substantia Nigra and Ventral Tegmental Area in Parkinson's Disease and Alzheimer's Disease,” in *Basic, Clinical, and Therapeutic Aspects of Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Volume 1*, eds. T. Nagatsu, A. Fisher, and M. Yoshida (Boston, MA: Springer New York), 377–380. doi:10.1007/978-1-4684-5844-2_77.
- Rotter, A., Birdsall, N. J. M., Burgen, A. S. V., Field, P. M., Hulme, E. C., and Raisman, G. (1979). Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. I. Technique for autoradiographic localization of the binding of $[3H]$ propylbenzilylcholine mustard and its distribution in the forebrain. *Brain Res. Rev.* 1, 141–165. doi:10.1016/0165-0173(79)90002-X.

Literaturverzeichnis

- Samadi, P., Rajput, A., Calon, F., Grégoire, L., Hornykiewicz, O., Rajput, A. H., et al. (2009). Metabotropic Glutamate Receptor II in the Brains of Parkinsonian Patients. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68, 374–382. Available at: <http://dx.doi.org/10.1097/NEN.0b013e31819cabe4>.
- Sargent, P. B. (2000). “The Distribution of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors,” in *Neuronal Nicotinic Receptors*, eds. F. Clementi, D. Fornasari, and C. Gotti (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 163–192. doi:10.1007/978-3-642-57079-7_7.
- Schwartz, R. K. W., and Huston, J. P. (1996a). The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog. Neurobiol.* 50, 275–331. doi:10.1016/S0301-0082(96)00040-8.
- Schwartz, R. K. W., and Huston, J. P. (1996b). UNILATERAL 6-HYDROXYDOPAMINE LESIONS OF MESO-STRIATAL DOPAMINE NEURONS AND THEIR PHYSIOLOGICAL SEQUELAE. *Prog. Neurobiol.* 49, 215–266. doi:10.1016/S0301-0082(96)00015-9.
- Schwartz, R. D., Lehmann, J., and Kellar, K. J. (1984). Presynaptic Nicotinic Cholinergic Receptors Labeled by [3H]Acetylcholine on Catecholamine and Serotonin Axons in Brain. *J. Neurochem.* 42, 1495–1498. doi:10.1111/j.1471-4159.1984.tb02818.x.
- Sgard, F., Charpentier, E., Bertrand, S., Walker, N., Caput, D., Graham, D., et al. (2002). A Novel Human Nicotinic Receptor Subunit, alpha 10, That Confers Functionality to the alpha 9-Subunit. *Mol. Pharmacol.* 61, 150–159. doi:10.1124/mol.61.1.150.
- Shen, J., Ma, J., Elsaidi, G. A., Lee, C. A., Smith, T. L., Tan, K. H., et al. (2005). Gene expression of myogenic regulatory factors following intramuscular injection of botulinum A toxin in juvenile rats. *Neurosci. Lett.* 381, 207–210. doi:https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.11.098.
- Shi, Y., Oury, F., Yadav, V. K., Wess, J., Liu, X. S., Guo, X. E., et al. (2010). Signaling through the M3 Muscarinic Receptor Favors Bone Mass Accrual by Decreasing Sympathetic Activity. *Cell Metab.* 11, 231–238. doi:10.1016/j.cmet.2010.01.005.
- Sivam, S. P., Norris, J. C., Lim, D. K., Hoskins, B., and Ho, I. K. (1983). Effect of Acute and Chronic Cholinesterase Inhibition with Diisopropylfluorophosphate on Muscarinic, Dopamine, and GABA Receptors of the Rat Striatum. *J. Neurochem.* 40, 1414–1422. doi:10.1111/j.1471-4159.1983.tb13584.x.
- Speckmann, E.-J., Hescheler, J., and Köhling, R. (2013). *Physiologie*. 6. Auflage. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- Spehlmann, R., and Stahl, S. (1976). DOPAMINE ACETYLCHOLINE IMBALANCE IN PARKINSON’S DISEASE: Possible Regenerative Overgrowth of Cholinergic Axon Terminals. *Lancet* 307, 724–726. doi:https://doi.org/10.1016/S0140-6736(76)93095-6.
- Standaert, D. G., Testa, C. M., Young, A. B., and Penney, J. B. (1994). Organization of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor gene expression in the basal ganglia of the rat. *J. Comp. Neurol.* 343, 1–16. doi:10.1002/cne.903430102.
- Sugita, S., Uchimura, N., Jiang, Z. G., and North, R. A. (1991). Distinct muscarinic receptors inhibit release of gamma-aminobutyric acid and excitatory amino acids in mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2608–2611. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC51282/>.
- Svensson, A.-L., Alafuzoff, I., and Nordberg, A. (1992). Characterization of muscarinic receptor subtypes in Alzheimer and

Literaturverzeichnis

- control brain cortices by selective muscarinic antagonists. *Brain Res.* 596, 142–148. doi:10.1016/0006-8993(92)91541-L.
- Tarazi, F., Campbell, A., Yeghiayan, S., and Baldessarini, R. (1998). Localization of ionotropic glutamate receptors in caudate-putamen and nucleus accumbens septi of rat brain: comparison of NMDA, AMPA, and kainate receptors. *Synap. (New York)*, 227–35. doi:10.1002/(SICI)1098-2396(199810)30:2<227::AID-SYN13>3.0.CO;2-Z.
- Tarazi, F. I., Zhang, K., and Baldessarini, R. J. (2000). Effects of nigrostriatal dopamine denervation on ionotropic glutamate receptors in rat caudate-putamen. *Brain Res.* 881, 69–72. doi:10.1016/S0006-8993(00)02812-2.
- Testa, C. M., Standaert, D. G., Young, A. B., and Penney, J. B. (1994). Metabotropic glutamate receptor mRNA expression in the basal ganglia of the rat. *J. Neurosci.* 14, 3005–3018. doi:10.1523/JNEUROSCI.14-05-03005.1994.
- Tieu, K. (2011). A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1, a009316. doi:10.1101/cshperspect.a009316.
- Tränkle, C., Andresen, I., Lambrecht, G., and Mohr, K. (1998). M<sub>2</sub> Receptor Binding of the Selective Antagonist AF-DX 384: Possible Involvement of the Common Allosteric Site. *Mol. Pharmacol.* 53, 304 LP-312. Available at: <http://molpharm.aspetjournals.org/content/53/2/304.abstract>.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., et al. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol. Rev.* 62, 405 LP-496. Available at: <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/62/3/405.abstract>.
- Trenkwalder, C., Krukemeyer, M. G., Möllenhoff, G., and Trautmann, E. (2011). *Parkinson - Die Krankheit verstehen und bewältigen*. Stuttgart, Deutschland: Schattauer.
- Ungerstedt, U. (1968). 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 5, 107–110. doi:10.1016/0014-2999(68)90164-7.
- Valuskova, P., Farar, V., Forczek, S., Krizova, I., and Myslivecek, J. (2018). Autoradiography of (3)H-pirenzepine and (3)H-AFDX-384 in Mouse Brain Regions: Possible Insights into M(1), M(2), and M(4) Muscarinic Receptors Distribution. *Front. Pharmacol.* 9, 124. doi:10.3389/fphar.2018.00124.
- Visanji, N. P., Brooks, P. L., Hazrati, L.-N., and Lang, A. E. (2013). The prion hypothesis in Parkinson's disease: Braak to the future. *Acta Neuropathol. Commun.* 1, 2. doi:10.1186/2051-5960-1-2.
- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., et al. (2014). Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol. Res.* 63 Suppl 1, S191-203. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24564659>.
- Wang, Q., Li, J., Wei, X., Liao, J., Xu, Y., Lu, T., et al. (2014a). Alterations of NMDA receptor binding in various brain regions among 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonian rats. doi:10.3109/00207454.2013.853058.
- Wang, Q., Wei, X., Gao, H., Li, J., Liao, J., Liu, X., et al. (2014b). Simvastatin reverses the downregulation of M1/4 receptor binding in 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian rats: The association with improvements in long-term memory. *Neuroscience* 267, 57–66. doi:10.1016/J.NEUROSCIENCE.2014.02.031.
- Weaver, F. M., Follett, K., Stern, M., Hur, K., Harris, C., Marks, W. J., et al. (2009). Bilateral Deep Brain Stimulation vs

Literaturverzeichnis

- Best Medical Therapy for Patients With Advanced Parkinson Disease: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 301, 63. doi:10.1001/jama.2008.929.
- Wedekind, F., Oskamp, A., Lang, M., Hawlitschka, A., Zilles, K., Wree, A., et al. (2018). Intrastriatal administration of botulinum neurotoxin A normalizes striatal D2R binding and reduces striatal D1R binding in male hemiparkinsonian rats. *J. Neurosci. Res.* 96, 75–86. doi:10.1002/jnr.24110.
- Weiner, D. M., Levey, A. I., and Brann, M. R. (1990). Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 7050–7054. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC54680/>.
- Wong, E. H., Kemp, J. A., Priestley, T., Knight, A. R., Woodruff, G. N., and Iversen, L. L. (1986). The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 7104–7108. doi:10.1073/pnas.83.18.7104.
- Wree, A., Mix, E., Hawlitschka, A., Antipova, V., Witt, M., Schmitt, O., et al. (2011). Intrastriatal botulinum toxin abolishes pathologic rotational behaviour and induces axonal varicosities in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 41, 291–298. doi:10.1016/j.nbd.2010.09.017.
- Wright, R. A., Arnold, M. B., Wheeler, W. J., Ornstein, P. L., and Schoepp, D. D. (2001). [LY341495 Binding to Group II Metabotropic Glutamate Receptors in Rat Brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 453 LP-460. Available at: <http://jpet.aspetjournals.org/content/298/2/453.abstract>.
- Wüllner, U., Testa, C. M., Catania, M. V., Young, A. B., and Penney, J. B. (1994). Glutamate receptors in striatum and substantia nigra: Effects of medial forebrain bundle lesions. *Brain Res.* 645, 98–102. doi:10.1016/0006-8993(94)91642-X.
- Xiao, Y., and Kellar, K. J. (2004). The Comparative Pharmacology and Up-Regulation of Rat Neuronal Nicotinic Receptor Subtype Binding Sites Stably Expressed in Transfected Mammalian Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310, 98 LP-107. Available at: <http://jpet.aspetjournals.org/content/310/1/98.abstract>.
- Yamada, S., Isogai, M., Okudaira, H., and Hayashi, E. (1983). Correlation between cholinesterase inhibition and reduction in muscarinic receptors and choline uptake by repeated diisopropylfluorophosphate administration: antagonism by physostigmine and atropine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 226, 519–525. Available at: <http://jpet.aspetjournals.org/content/226/2/519>.
- Yan, Z., Flores-Hernandez, J., and Surmeier, D. J. (2001). Coordinated expression of muscarinic receptor messenger RNAs in striatal medium spiny neurons. *Neuroscience* 103, 1017–1024. doi:https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00039-2.
- Zavitsanou, K., Mitsacos, A., Giompres, P., and Kouvelas, E. D. (1996). Changes in [3H]AMPA and [3H]kainate binding in rat caudate-putamen and nucleus accumbens after 6-hydroxydopamine lesions of the medial forebrain bundle: an autoradiographic study. *Brain Res.* 731, 132–140. doi:10.1016/0006-8993(96)00489-1.
- Zhang, H.-M., Chen, S.-R., and Pan, H.-L. (2007). Regulation of Glutamate Release From Primary Afferents and Interneurons in the Spinal Cord by Muscarinic Receptor Subtypes. *J. Neurophysiol.* 97, 102–109. doi:10.1152/jn.00586.2006.
- Zhou, F.-M., Wilson, C., and Dani, J. A. (2003). Muscarinic and Nicotinic Cholinergic Mechanisms in the Mesostriatal Dopamine Systems. *Neurosci.* 9, 23–36. doi:10.1177/1073858402239588.
- Zhou, F. M., Liang, Y., and Dani, J. (2002a). Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the

Literaturverzeichnis

- striatum. *Nat. Neurosci.* 4, 1224–1229.
- Zhou, F. M., Wilson, C. J., and Dani, J. A. (2002b). Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J. Neurobiol.* 53, 590–605. doi:10.1002/neu.10150.
- Zigmond, M. J., Berger, T. W., Grace, A. A., and Stricker, E. M. (1989). Compensatory responses to nigrostriatal bundle injury. *Mol. Chem. Neuropathol.* 10, 185–200. doi:10.1007/BF03159728.
- Zoli, M., Moretti, M., Zanardi, A., McIntosh, J. M., Clementi, F., and Gotti, C. (2002). Identification of the Nicotinic Receptor Subtypes Expressed on Dopaminergic Terminals in the Rat Striatum. *J. Neurosci.* 22, 8785–8789. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-20-08785.2002.
- Zolles, G., Wagner, E., Lampert, A., and Sutor, B. (2009). Functional Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptors in Rat Neocortical Layer 5 Pyramidal Cells. *Cereb. Cortex* 19, 1079–1091. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/cercor/bhn158>.
- Zubieta, J. K., and Frey, K. A. (1993). Autoradiographic mapping of M3 muscarinic receptors in the rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264, 415–422. Available at: <http://jpet.aspetjournals.org/content/264/1/415>.

6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Details über die in der Arbeit verwendeten Gruppen mit den entsprechenden Überlebenszeiten.....	33
Tabelle 2: Liste der analysierten Rezeptoren mit den jeweils spezifischen Liganden, nicht radioaktiven Verdränger, Wasch- und Inkubationsdetails	36
Tabelle 3: Zusammenfassung der mittleren RD (MW) pro Fläche der einzelnen Hirnareale für alle analysierten Rezeptoren	I
Tabelle 4: Autoradiographisch bestimmte RD für den nACh-Rezeptor aus publizierter Literatur und den eigenen Ergebnissen im Vergleich und Überblick für die Versuchsgruppe K	III
Tabelle 5: Autoradiographisch bestimmte RD für die mACh-Rezeptoren aus publizierter Literatur und den eigenen Ergebnissen im Vergleich und Überblick für die Versuchsgruppe K	III
Tabelle 6: Übersicht der Ergebnisse aus der publizierten Literatur für Veränderungen der acetylcholinergen RD aus verschiedene Tiermodelle mit MP und menschlichen MP-Erkrankten.....	IV
Tabelle 7: Autoradiographisch bestimmte RD für den Kainat-Rezeptor aus publizierter Literatur und den eigenen Ergebnissen im Vergleich und Überblick für die Versuchsgruppe K	VII
Tabelle 8: Autoradiographisch bestimmte RD für den mGlu 2/3-Rezeptor aus publizierter Literatur und den eigenen Ergebnissen im Vergleich und Überblick für die Versuchsgruppe K	VIII
Tabelle 9: Autoradiographisch bestimmte RD für den NMDA-Rezeptor aus publizierter Literatur und den eigenen Ergebnissen im Vergleich und Überblick für die Versuchsgruppe K	VIII
Tabelle 10: Übersicht der aus Forschungsergebnissen ermittelten striatalen Veränderungen der glutamergen RD für verschiedene Tiermodelle mit MP und menschliche MP-Erkrankten	VIII

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Ausbreitung der Parkinson-Krankheit nach Braak	4
Abbildung 2: Darstellung des direkten und indirekten Weges der Basalganglienschleife.....	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Angriffspunkte der verschiedenen Botulinum-Neurotoxin-Untergruppen am SNARE-Komplex	11
Abbildung 4: Schematischer Ablauf der normalen Transmitterexozytose (links) sowie der Wirkung von BoNT an der motorischen Endplatte (rechts)	13
Abbildung 5: Lokalisation des nACh-Rezeptors im Striatum.....	15

Literaturverzeichnis

Abbildung 6: Lokalisation des M ₁ -Rezeptors im Striatum	18
Abbildung 7: Lokalisation des M ₂ -Rezeptors im Striatum	20
Abbildung 8: Lokalisation des M ₃ -Rezeptors im Striatum	22
Abbildung 9: Lokalisation des NMDA-Rezeptors im Striatum	24
Abbildung 10: Lokalisation des mGlu 2/3-Rezeptors im Striatum	26
Abbildung 11: Lokalisation des Kainat-Rezeptors im Striatum	28
Abbildung 12: Schematische Darstellung eines SNpc Neurons mit den Mechanismen verschiedener Neurotoxine, die eine nigrostriatale Degeneration in Tiermodellen für MP auslösen können	30
Abbildung 13: Abgrenzung der Hirnareale in den Frontalschnitten für die linke und rechte Hemisphäre	39
Abbildung 14: Beispiele für Artefakte in Hirnschnitten, die für die Messung der RD ausgespart wurden	40
Abbildung 15: Autoradiogramme von Frontalschnitten für die einzelnen Rezeptoren in Hemiparkinson-Ratten 3 Monate nach intrastriataler BoNT-A-Injektion (Versuchsgruppe LB, Schnittebene 1)	43
Abbildung 16: Darstellung der mittleren RD für den Ligand [³ H]-Epibatidin des nAch-Rezeptors	44
Abbildung 17: Darstellung der mittleren RD für den Liganden [³ H]-Pirenzipin des M ₁ -Rezeptors	47
Abbildung 18: Darstellung der mittleren RD für den Agonist [³ H]-Oxotremorin des M ₂ -Rezeptors	50
Abbildung 19: Darstellung der mittleren RD für den Antagonist [³ H]-AF-DX 384 des M ₂ -Rezeptors	53
Abbildung 20: Darstellung der mittleren RD für den Ligand [³ H]-4-Damp des M ₃ -Rezeptors	56
Abbildung 21: Darstellung der mittleren RD für den Agonist [³ H]-Kainat des Kainat-Rezeptors	59
Abbildung 22: Darstellung der mittleren RD für den Ligand [³ H]-LY 341/495 des mGlu 2/3-Rezeptors	62
Abbildung 23: Darstellung der mittleren RD für den Ligand [³ H]-MK-801 des NMDA-Rezeptors	65
Abbildung 24: Darstellung der zeitlichen Veränderung der mittleren RD für den Ligand [³ H]-Epibatidin des nAch-Rezeptors	XI
Abbildung 25: Darstellung der zeitlichen Veränderung der mittleren RD für den Ligand [³ H]-Pirenzipin des M ₁ -Rezeptors	XII
Abbildung 26: Darstellung der zeitlichen Veränderung der mittleren RD für den Ligand [³ H]-Oxotremorin des M ₂ -Rezeptors	XIII
Abbildung 27: Darstellung der zeitlichen Veränderung der mittleren RD für den Ligand [³ H]-AF-DX-384 des M ₂ -Rezeptors	XIV
Abbildung 28: Darstellung der zeitlichen Veränderung der mittleren RD für den Ligand [³ H]-4-Damp des M ₃ -Rezeptors	XVI
Abbildung 29: Darstellung der zeitlichen Veränderung der mittleren RD für den Ligand [³ H]-Kainat des Kainat-Rezeptors	XVII
Abbildung 30: Darstellung der zeitlichen Veränderung der mittleren RD für den Ligand [³ H]-LY-341/495 des mGlu2/3-Rezeptors	XVIII
Abbildung 31: Darstellung der zeitlichen Veränderung der mittleren RD für den Ligand [³ H]-MK-801 des NMDA-Rezeptors	XIX

7. Anhang

7.1 Tabellenanhang

Tabelle 3: Zusammenfassung der mittleren RD (MW) pro Fläche der einzelnen Hirnareale für alle analysierten Rezeptoren

Angabe in fmol/mg Protein \pm SD (Standardabweichung) für die Versuchsgruppen: Kontrollgruppe (K), Hemiparkinson-Ratte mit BoNT-A (LB) und Hemiparkinson-Ratte mit Vehikel (LV) jeweils für die rechte und linke Hemisphäre. Mit Sternchen markiert sind die Werte der Areale, die unter 200 fmol/mg liegen und in dieser Arbeit aufgrund starker Abweichungen nicht weiter beschrieben werden.

Rezeptor	Hirn-areal	MW K rechts	MW K links	MW LB rechts	MW LB links	MW LV rechts	MW LV links
nAch ($[^3\text{H}]$-Epibatidin)	AcB	376 \pm 29	378 \pm 41	176 \pm 37	329 \pm 47	140 \pm 43	301 \pm 36
	CA1*	67 \pm 10	71 \pm 9	17 \pm 8,4	18 \pm 8,3	18 \pm 8,6	19,9 \pm 10
	CG	464 \pm 41	474 \pm 40	348 \pm 51	406 \pm 52	323 \pm 44	386 \pm 46
	CPu	378 \pm 19	389 \pm 31	158 \pm 24	328 \pm 30	129 \pm 22	314 \pm 24
	DG*	129 \pm 12	135 \pm 16	174 \pm 24	174 \pm 25	179 \pm 26	176 \pm 26
	Fr	708 \pm 82	742 \pm 77	845 \pm 154	858 \pm 170	813 \pm 172	863 \pm 213
	GP*	152 \pm 25	139 \pm 31	70 \pm 20	94 \pm 21	69 \pm 17	100 \pm 21
	LHB	306 \pm 25	318 \pm 48	263 \pm 53	296 \pm 49	276 \pm 62	305 \pm 48
	M	383 \pm 25	405 \pm 31	311 \pm 46	348 \pm 44	286 \pm 35	328 \pm 36
	MHB	3125 \pm 380	3179 \pm 524	2147 \pm 314	2234 \pm 349	2135 \pm 258	2218 \pm 317
	S	340 \pm 36	343 \pm 26	271 \pm 38	294 \pm 34	272 \pm 28	285 \pm 22
M₁ ($[^3\text{H}]$-Pirenzipin)	AcB	4478 \pm 2153	4328 \pm 2020	4561 \pm 1397	4604 \pm 1404	4340 \pm 1607	4379 \pm 1659
	CA1	4594 \pm 2366	4458 \pm 2168	5253 \pm 1509	5139 \pm 143	5063 \pm 1644	5020 \pm 1507
	CG	2429 \pm 1196	2468 \pm 1237	2839 \pm 827	2688 \pm 745	2388 \pm 701	2294 \pm 700
	CPu	3037 \pm 1431	3081 \pm 1420	2899 \pm 827	3071 \pm 891	2428 \pm 837	2633 \pm 913
	DG	4309 \pm 2236	4298 \pm 2187	4902 \pm 1465	4787 \pm 1424	4807 \pm 1616	4743 \pm 1570
	GP*	240 \pm 78	231 \pm 83	215 \pm 56	198 \pm 74	194 \pm 47	130 \pm 41
	M	2726 \pm 1313	2591 \pm 1171	3021 \pm 854	2690 \pm 698	2279 \pm 784	2121 \pm 642
	S	2265 \pm 1084	2004 \pm 863	2661 \pm 776	2316 \pm 561	2430 \pm 722	1939 \pm 460
M₂ ($[^3\text{H}]$-Oxotremorin-M)	AcB	762 \pm 72	723 \pm 59	787 \pm 79	778 \pm 67	720 \pm 46	713 \pm 48
	CA1	677 \pm 94	664 \pm 83	864 \pm 148	849 \pm 123	798 \pm 154	789 \pm 140
	CG	1096 \pm 83	1103 \pm 83	1265 \pm 112	1197 \pm 115	1064 \pm 98	1048 \pm 112
	CPu	931 \pm 108	878 \pm 77	886 \pm 84	928 \pm 84	817 \pm 86	857 \pm 89
	DG	431 \pm 63	435 \pm 59	461 \pm 45	465 \pm 41	450 \pm 45	457 \pm 46

Anhang

	GP*	71±8	64±4	78±25	76±30	73±25	70±30
	M	1244±129	1207±121	1458±155	1316±143	1246±153	1172±150
	S	1351±162	1244±117	1349±154	1341±129	1259±127	1212±144
	SN	307±48	295±39	387±65	402±49	339±50	368±36
M₂ ([³H]-AF DX 384)	AcB	3539±264	3347±287	2376±456	2636±519	2686±236	2876±166
	CA1	1869±430	1865±438	1923±260	1873±230	1859±229	1825±139
	CG	1777±191	1838±164	1808±196	1712±166	1711±157	1727±163
	CPu	3586±333	3528±297	2420±243	2827±160	2523±227	2945±138
	DG	1123±235	1158±251	1059±141	1054±141	1080±163	1077±149
	GP*	135±22	148±26	114±19	124±19	136±22	138±17
	M	2014±197	1886±195	1867±224	1712±157	1702±182	1629±144
	S	2108±178	1738±130	1799±192	1596±139	1792±157	1501±140
	SN	345±25	351±39	286±39	334±46	263±37	327±49
M₃ ([³H]-4- Damp)	AcB	8291±1182	7739±1026	5450±1004	5458±935	6153±1081	6101±862
	CA1	8456±1858	8349±1685	6796±983	6621±1011	6899±984	6837±982
	CG	5185±600	5049±656	5079±833	4828±180	4879±851	4913±882
	CPu	6912±672	6850±659	4713±587	4861±596	5101±656	5178±671
	DG	7460±1860	7286±1763	5808±923	5805±985	6254±951	6220±1037
	GP	626±62	620±64	398±71	363±588	410±92	386±77
	M	6573±1584	6302±1377	5682±935	5310±846	5326±908	5211±901
	S	6081±1310	5756±1235	4753±800	4307±623	4931±732	4475±574
	SN	327±50	324±47	367±83	437±118	390±77	490±123
Kainat ([³H]-Kainat)	AcB	1429±142	1386±182	1271±148	1272±159	1266±86	1290±114
	CA1	438±68	455±51	437±55	420±53	435±43	424±44
	CG	1131±44	1168±68	988±144	985±140	1012±105	994±107
	CPu	1196±89	1196±102	1091±111	1114±111	1140±82	1134±64
	DG	761±104	802±87	810±100	777±92	802±75	783±56
	GP	216±24	229±19	223±47	233±43	226±39	244±33
	M	1104±95	1074±89	1081±150	1018±123	1066±102	968±82
	S	824±80	827±80	921±103	861±123	902±83	829±141
	CA3	1105±107	1227±112	1110±109	1101±111	1145±94	1138±84
mGlu2/3 ([³H]- LY 341/495)	AcB	3422±740	3236±393	3276±854	3172±622	3173±531	3172±582
	CA1	3617±418	3645±432	3065±403	3013±412	3121±385	3145±513
	CG	4314±441	4301±330	4556±507	4518±477	4351±406	4353±487
	CPu	3415±516	3386±519	3213±370	3951±293	3105±295	3007±290
	DG	4300±622	4115±526	3812±412	3913±482	3956±496	4088±646
	GP	1471±321	1352±250	978±145	1189±223	1053±91	1209±183
	M	5081±497	4815±704	4208±535	4048±417	4008±392	3746±326

Anhang

	S	5290±620	5203±927	4404±573	4029±672	4619±460	3436±516
	CA3	2835±495	2783±408	2408±298	2384±280	2507±288	2461±337
NMDA ([³H]-MK-801)	AcB	1597±132	1565±55	1546±142	1513±140	1664±161	1626±177
	CA1	3222±131	3195±143	3341±199	3337±202	3488±183	3485±251
	CG	1918±106	1968±145	1933±161	1898±158	2099±196	2002±171
	CPu	1194±85	1186±48	1025±61	1071±62	1159±71	1169±73
	DG	2786±88	2761±127	2742±151	2754±143	2938±125	2946±146
	GP*	231±35	228±28	151±41	159±32	212±31	209±22
	M	1960±127	1890±196	1759±140	1747±107	1899±178	1815±120
	S	1770±118	1678±155	1839±155	1680±143	2092±233	1781±177
	CA3	1893±92	1845±92	1975±123	1938±131	2112±93	2075±130

Tabelle 4: Autoradiographisch bestimmte RD für den nAch-Rezeptor aus publizierter Literatur und den eigenen Ergebnissen im Vergleich und Überblick für die Versuchsgruppe K

Hirnareal	Gruppe K in fmol/mg	(Bauer et al., 2005) Kontrolle in fmol/mg	(Palomero- Gallagher et al., 2008) Kontrolle in fmol/mg	(Haghir et al., 2009) Kontrolle in fmol/mg	(Cremer et al., 2015) Kontrolle in fmol/mg
CPu	378	457	94	125	558
CA1	67	45	-	39	229
DG	129	208	-	59	273
CG	464	578	-	-	-
Fr	708	460	-	-	-
AcB	376	398	86	-	-
GP	152	-	32	-	-

Tabelle 5: Autoradiographisch bestimmte RD für die mACh-Rezeptoren aus publizierter Literatur und den eigenen Ergebnissen im Vergleich und Überblick für die Versuchsgruppe K

Rezeptor	Hirnareal	Gruppe K in fmol/mg	(Bauer et al., 2005) Kontrolle in fmol/mg	(Palomero- Gallagher et al., 2008) Kontrolle in fmol/mg	(Haghir et al., 2009) Kontrolle in fmol/mg	(Cremer et al., 2015) Kontrolle in fmol/mg
M₁ ([³H]- Pirenzipin)	CPu	3037	4121	432	506	7105
	CA1	4594	6923	-	448	7136

Anhang

	DG	4309	7628	-	518	7279
	CG	2429	4754	-	-	-
	Fr	-	4666	-	-	-
	AcB	4478	6510	546	-	-
	GP	240	-	45	-	-
M₂ ([³H]-Oxotremorin)	CPu	931	-	94	166	1976
	CA1	677	-	-	93	602
	DG	431	-	-	60	402
	AcB	762	-	80	-	-
	GP	71	-	23	-	-
M₂ ([³H]-AF-DX 384)	CPu	3586	4105	-	-	4932
	CA1	1869	2494	-	-	1100
	DG	1123	1715	-	-	705
	CG	1777	3233	-	-	-
	Fr	-	3260	-	-	-
	AcB	3539	4453	-	-	-
M₃ ([³H]-4-Damp)	CPu	6912	-	1042	216	8507
	CA1	8456	-	-	221	7518
	DG	7460	-	-	253	6336
	AcB	8291	-	1046	-	-
	GP	626	-	209	-	-

Tabelle 6: Übersicht der Ergebnisse aus der publizierten Literatur für Veränderungen der acetylcholinergen RD aus verschiedene Tiermodelle mit MP und menschlichen MP-Erkrankten

Rezeptor-Subtyp	Spezies/Modell	Überlebenszeit	Detektionsmethode	Ligand	Effekt	Quelle
nAch	menschlicher MP-Patient	-	post mortem (Homo-genate)	[³ H]-Nikotin	Reduktion (Kortex, Hippocampus), Unverändert (CPu)	(Lange et al., 1993)
nAch	menschlicher MP-Patient	-	post mortem (Scheiben)	[³ H]-Methylcarbamylcholin	Reduktion (74% Striatum, 65% temporalen Kortex, 39% Hippocampus, 55% frontalen Kortex)	(Aubert et al., 1992)

Anhang

nAch	Menschlicher MP-Patient	-	PET	2- ^[18F] -FA-85380	Reduktion (20% CPU, AcB 20-40%, Hippocampus 25%, Parietallappen 50%, Occipitallappen 25%, Temporallappen 35%)	(Meyer et al., 2009)
nAch	menschlicher MP-Patient	-	post mortem	[³ H]-Cytisin	Reduktion (25% Striatum)	(Durany et al., 2000)
nAch	menschlicher MP-Patient	-	PET	2- ^[18F] Fluor-A-85380	Reduktion (10% Striatum, 14,9% SN)	(Kas et al., 2009)
nAch	Läsionierung im MVB	2Woche	Ligandenbindungs-technik	[³ H]-Epibatidin	Reduktion (50%)	(Zoli et al., 2002)
nAch	Läsionierung im MVB	3 Wochen	Autoradiographie	[¹²⁵ I]-Epibatidin	Reduktion (36% Striatum, 25% AcB)	(Pradhan et al., 2002)
nAch	Läsionierung im MVB	<i>Unbekannt</i>	Autoradiographie	[³ H]-Acetylcholin	Reduktion (29% Striatum, Hypothalamus)	(Schwartz et al., 1984)
nAch	Läsionierung im MVB	3 Wochen	Autoradiographie	[³ H]-Nikotin	Reduktion (25-33% Striatum, ~40% AcB)	(Clarke and Pert, 1985)
nAch	Läsionierung im MVB	4-5 Wochen	Autoradiographie	[¹²⁵ I]-Epibatidin	Reduktion (47% Striatum)	(Perez et al., 2010)
nAch	Läsionierung Dimesencephalon-Kreuzung	19 Tage	Autoradiographie	[³ H]-Nikotin	Reduktion (30% CPu und AcB, 40% VTA und SNpc)	(Härfstrand et al., 1987)
nAch	Läsionierung mit MPTP	4- Wochen	Autoradiographie	[¹²⁵ I]-Epibatidin	Reduktion (40-50% Striatum)	(Kulak et al., 2002)
nAch	Pitx3ak Maus	4-6 Monate	Autoradiographie	[³ H]-Epibatidin	Reduktion (CPu 47%, Hippocampus 9-15%, DG 16%, M und S +1-3%)	(Cremer et al., 2015)
M₁	menschlicher MP-Patient	-	post mortem (Homo-genate)	[³ H]-Pirenzipin	Reduktion	(Lange et al., 1993)
M₁	menschlicher MP-Patient	-	post mortem (Scheiben)	[³ H]-Pirenzipin	Unverändert	(McOmish et al., 2017)

Anhang

M₁	menschlicher MP-Patient	-	post mortem	[³ H]-Pirenzipin	Reduktion (CG 30%), Unverändert (CPu und GP)	(Piggott et al., 2003)
M₁	menschlicher MP-Patient	-	post mortem	[³ H]-Pirenzipin	Unverändert	(Aubert et al., 1992)
M₁	Läsionierung im MVB	1 Jahr	Autoradiographie	[³ H]-Pirenzipin	Reduktion (26% Striatum)	(Dawson et al., 1991)
M₁	Läsionierung im MVB	1 Jahr	Autoradiographie	[³ H]-QNB	Reduktion (33% Striatum)	(Dawson et al., 1991)
M₁	Läsionierung im MVB	3 Wochen	Autoradiographie	[³ H]-Pirenzipin	Unverändert	(Wang et al., 2014a)
M₁	Läsionierung im MVB	10-13 Tage	SPECT	[¹²³ I]Iodo-dexetimide	Unverändert	(Knol et al., 2014)
M₁	Läsionierung im MVB	8 Wochen	Autoradiographie	[³ H]-QNB	Reduktion (12-17% Striatum)	(Araki et al., 2000)
M₁	Läsionierung SN (6-OHDA)	3 Wochen	Autoradiographie	[³ H]-Pirenzipin	Reduktion (15-29%)	(Joyce, 1991)
M₁	Pitx3ak Maus	4-6 Monate	Autoradiographie	[³ H]-Pirenzipin	Reduktion (CPu 17%, Hippocampus 5-9%, DG 12% und S 8%)	(Cremer et al., 2015)
M₂	Menschlicher MP-Patient	-	post mortem (Homo-genate)	[³ H]-Oxotremorin	Unverändert	(Lange et al., 1993)
M₂	Menschlicher MP-Patient	-	post mortem (Scheiben)	[³ H]-AF-DX 384	Unverändert	(McOmish et al., 2017)
M₂	menschlicher MP-Patient	-	post mortem	[³ H]-AF-DX 384	Reduktion (11% CPu, 12% CG), Unverändert (GP)	(Piggott et al., 2003)
M₂	Menschlicher MP-Patient	-	post mortem	[³ H]-AF-DX 116	Reduktion (67% Hippocampus, 55% frontalen Kortex , 39% temporalen Kortex), Unverändert (Thalamus und CPu)	(Aubert et al., 1992)
M₂	Läsionierung der VTA (6-OHDA)	7-14 Tage	Autoradiographie	[³ H]-Oxotremorin	signifikante Reduktion (AcB 9-15%)	(Belleruche et al., 1982)
M₂	Läsionierung	4	Autoradiographie	[³ H]-	Reduktion (frontalen	(Liskowsky

Anhang

	der VTA (6-OHDA)	Wochen	graphie	Oxotremorin	Kortex 13%)	and Potter, 1985)
M₂	Läsionierung SN (6-OHDA)	3 Wochen	Autoradiographie	[³ H]-NMS	Reduktion (24-30% CPu)	(Joyce, 1991)
M₂	Pitx3ak Maus	4-6 Monate	Autoradiographie	[³ H]-Oxotremorin	Reduktion (CPu 19%, S 12%, SN 7% und M 3%), Steigerung (DG 5%, Hippocampus 2%)	(Cremer et al., 2015)
M₂	Pitx3ak Maus	4-6 Monate	Autoradiographie	[3H]-AF-DX 384	Steigerung (Kortex 3-13%, Hippocampus 2-4% und SN 12%), Unverändert (CPu)	(Cremer et al., 2015)
M₃	Menschlicher MP-Patient	-	post mortem (Scheiben)	[3H]-4-Damp	Zunahme (CPu und Broadman-Areal 9)	(McOmish et al., 2017)
M₃	Pitx3ak Maus	4-6 Monate	Autoradiographie	[3H]-4-Damp	Steigerung (Kortex 13-21%, CPu 3% und SN 15%)	(Cremer et al., 2015)
M₁₋₅	Läsionierung im MVB	8 Wochen	Autoradiographie	[3H]-QNB	Reduktion (12-17%)	(Araki et al., 2000)

Tabelle 7: Autoradiographisch bestimmte RD für den Kainat-Rezeptor aus publizierter Literatur und den eigenen Ergebnissen im Vergleich und Überblick für die Versuchsgruppe K

Hirnareal	Gruppe K in fmol/mg	(Bauer et al., 2005) Kontrolle in fmol/mg	(Palomero-Gallagher et al., 2008) Kontrolle in fmol/mg	(Haghir et al., 2009) Kontrolle in fmol/mg	(Cremer et al., 2015) Kontrolle in fmol/mg
CPu	1196	2805	245	713	2254
CA1	438	1307	-	229	1076
DG	761	3079	-	459	1924
CG	1131	3761	-	-	-
CA3	1105	2534	-	469	1842
AcB	1429	3663	279	-	-
GP	216	-	115	-	-

Tabelle 8: Autoradiographisch bestimmte RD für den mGlu 2/3-Rezeptor aus publizierter Literatur und den eigenen Ergebnissen im Vergleich und Überblick für die Versuchsgruppe K

Hirnareal	Gruppe K in fmol/mg	(Cremer et al., 2015) Kontrolle in fmol/mg	(Wright et al., 2001) Kontrolle in fmol/mg
CPu	3415	8956	2126
CA1	3617	4896	1940 (mit CA3)
DG	4300	8689	-
CA3	2835	3145	-
M	5081	10692	2477
S	5290	11239	-

Tabelle 9: Autoradiographisch bestimmte RD für den NMDA-Rezeptor aus publizierter Literatur und den eigenen Ergebnissen im Vergleich und Überblick für die Versuchsgruppe K

Hirnareal	Gruppe K in fmol/mg	(Bauer et al., 2005) Kontrolle in fmol/mg	(Palomero- Gallagher et al., 2008) Kontrolle in fmol/mg	(Haghir et al., 2009) Kontrolle in fmol/mg	(Cremer et al., 2015) Kontrolle in fmol/mg
CPu	1194	1149	245	862	1493
CA1	3222	4084	-	1683	4751
DG	2786	4879	-	1682	3713
CG	1918	2783	-	-	-
CA3	1893	2704	-	1243	
AcB	1597	2014	801	-	-
GP	231	-	196	-	-

Tabelle 10: Übersicht der aus Forschungsergebnissen ermittelten striatalen Veränderungen der glutamergen RD für verschiedene Tiermodelle mit MP und menschliche MP-Erkrankten

Rezeptor-Subtyp	Spezies/Modell	Überlebenszeit	Detektionsmethode	Ligand	Effekt	Quelle
Kainat	Läsionierung SN (6-OHDA)	1 Woche	Autoradiographie	[³ H]-Kainat	Reduktion (11% CPu)	(Tarazi et al., 1998)
Kainat	Läsionierung SN (6-OHDA)	5 Wochen	Autoradiographie	[³ H]-Kainat	Steigerung (20% CPu)	(Tarazi et al., 2000)
Kainat	Läsionierung im MVB	1 Woche - 3	Autoradiographie	[³ H]-Kainat	Reduktion (Striatum 10%, SNpr)	(Wüllner et al.,

Anhang

		Monate				1994)
Kainat	Läsionierung im MVB	4 Wochen	Autoradiographie	[³ H]-Kainat	Reduktion (CPu und AcB 17%- 26%)	(Zavitsano u et al., 1996)
mGlu2/3	Menschlicher MP-Patient	-	post mortem	[³ H]-LY 341/495	Reduktion (22% Caudatus, 30% GP),	(Samadi et al., 2009)
mGlu2/3	Läsionierung im MVB	3 Wochen	Autoradiographie; Western Blot	[³ H]-LY 379/268	Steigerung (Striatum)	(Picconi et al., 2002)
mGlu2/3	Läsionierung in STN mit MPTP (Affen)	24 h nach letzter Behandlung	Autoradiographie	[³ H]-LY 341/495	Zunahme (Nucleus caudatus und CPu), Unverändert (lateraler Teil Striatum)	(Jourdain et al., 2015)
mGlu2/3	Läsionierung im MVB	1 Woche - 3 Monate	Autoradiographie	[³ H]-Glutamat	Reduktion (Neostriatum 10%, SNpr)	(Wüllner et al., 1994)
NMDA	Menschlicher MP-Patient	-	post mortem	[³ H]-MK-801	Reduktion (Nucleus Caudatus Kopf -42% und Körper -38%)	(Gerlach et al., 1996)
NMDA	Läsionierung im MVB	3 Wochen	Autoradiographie	[³ H]-MK-801	Reduktion (Hippocampus 22,4%, CPu 14,1%, AcB 13,8%, CG 13,4%, Amygdala 14,5%, piriformer Kortex 9%)	(Wang et al., 2014a)
NMDA	Läsionierung im MVB	3 Wochen	Autoradiographie	[³ H]-MK-801	Reduktion (37%: CG, piriformen Kortex und Amygdala)	(Betarbet et al., 2004)
NMDA	Läsionierung im MVB	48h nach Verhaltenstest	Autoradiographie	[³ H]-DCG-IV	Reduktion (68% bzw. 62% Striatum)	(Dunah et al., 2000)
NMDA	Läsionierung im MVB	1 Woche - 3 Monate	Autoradiographie	[³ H]-Glutamat	Reduktion (Neostriatum 10% - 13 %, SNpr)	(Wüllner et al., 1994)
NMDA	Läsionierung SN (6-OHDA)	1 Woche	Autoradiographie	[³ H]-MK-801	Reduktion (17% CPu)	(Tarazi et al., 1998)
NMDA	Läsionierung SN (6-OHDA)	5 Wochen	Autoradiographie	[³ H]-MK-801	Reduktion (3% CPu)	(Tarazi et al., 2000)

Anhang

NMDA	Läsionierung im MVB	3 Wochen	Western Blot		Steigerung (Striatum)	(Gan et al., 2014)
NMDA	Läsionierung in STN mit MPTP (Affen)	24 h nach letzter Behandlung	Autoradiographie	[³ H]-RO 25 6981	Unverändert	(Jourdain et al., 2015)
NMDA	Läsionierung mit MPTP	4 Monate	Autoradiographie	[¹²⁵ I]-MK-801	Unverändert (CPu)	(He et al., 2000)
NMDA	MPTP in C57bl6-Mäuse	2 Wochen	Autoradiographie	[³ H]-Glutamat	Reduktion (57% Striatum)	(Wüllner et al., 1994)

7.2 Abbildungsanhang

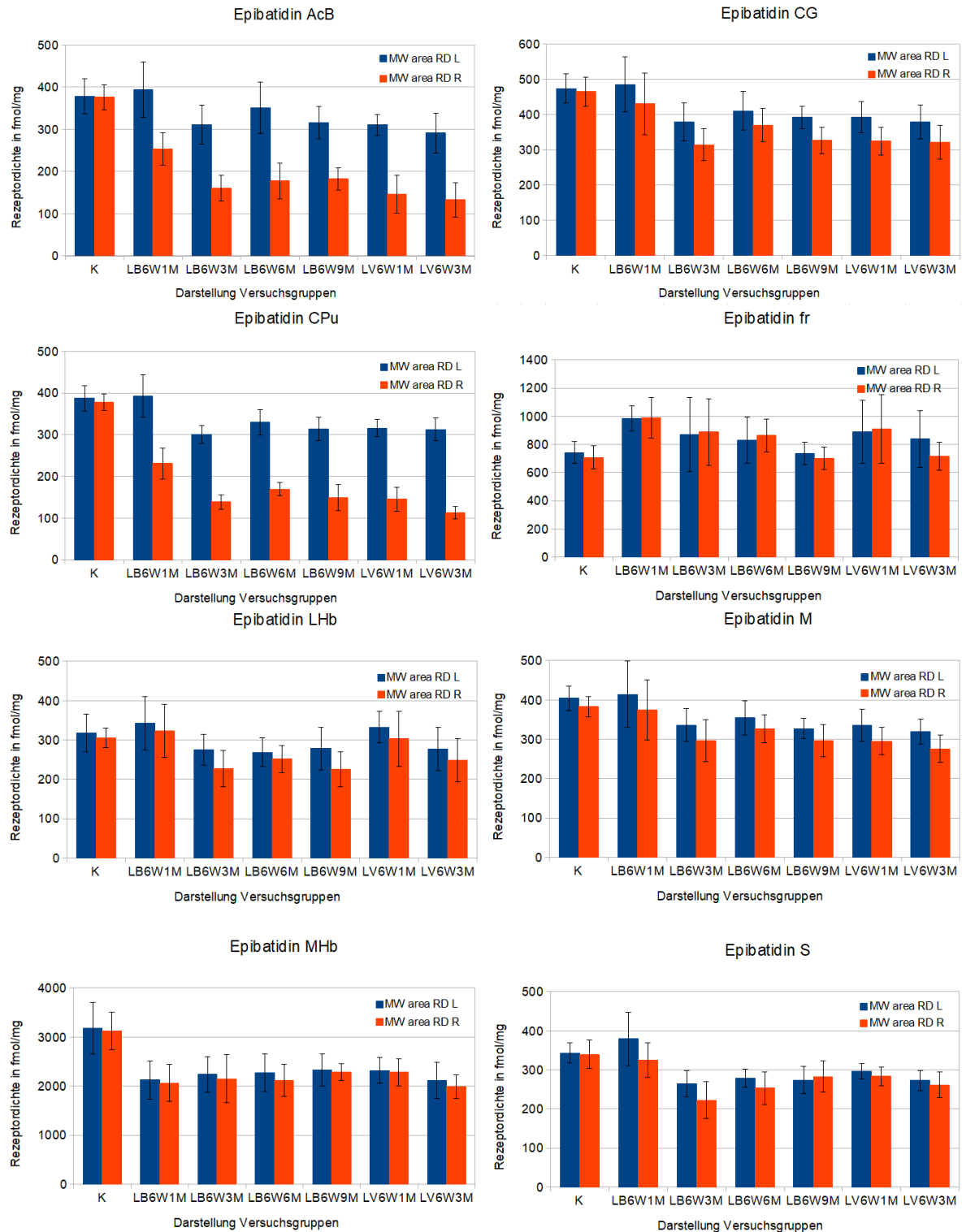


Abbildung 24: Darstellung der zeitlichen Veränderung der mittleren RD für den Ligand $[^3\text{H}]$ -Epibatidin des nAch-Rezeptors

Zeitraum über 3-9 Monate für die Versuchsgruppen LB und LV an Hemiparkinson-Ratten für alle Hirnregion mit RD > 200 fmol/mg. Die orangen Balken repräsentieren den MW der RD der rechten (läsionierten) Hemisphäre pro Fläche und die blauen Balken stellen den MW pro Fläche für die RD der linken Hemisphäre dar.

Anhang

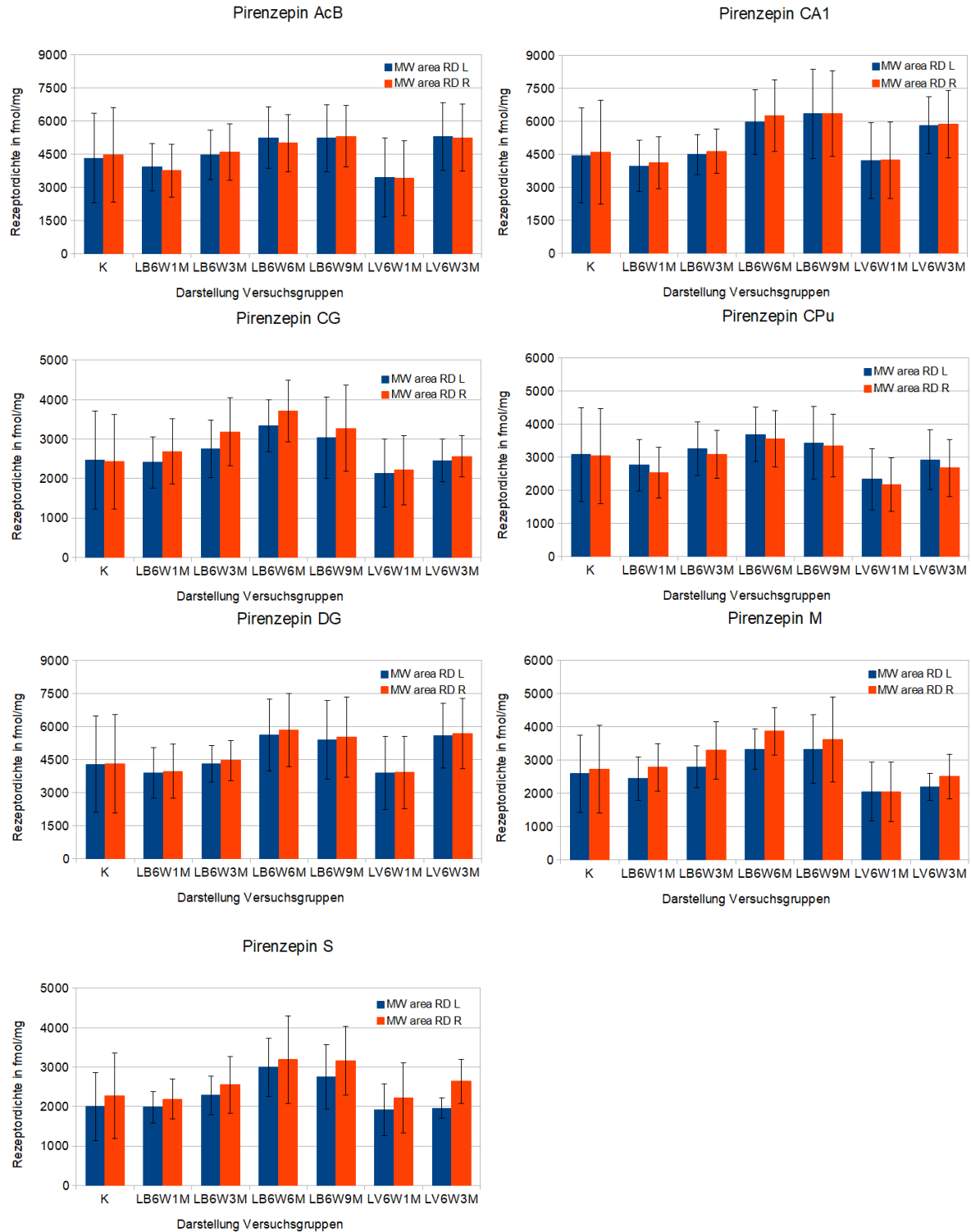


Abbildung 25: Darstellung der zeitlichen Veränderung der mittleren RD für den Ligand $[^3\text{H}]$ -Pirenzepin des M_1 -Rezeptors

Zeitraum über 3-9 Monate für die Versuchsgruppen LB und LV an Hemiparkinson-Ratten für alle Hirnregion mit $\text{RD} > 200 \text{ fmol/mg}$. Die orangen Balken repräsentieren den MW der RD der rechten (läsionierten) Hemisphäre pro Fläche und die blauen Balken stellen den MW pro Fläche für die RD der linken Hemisphäre da.

Anhang

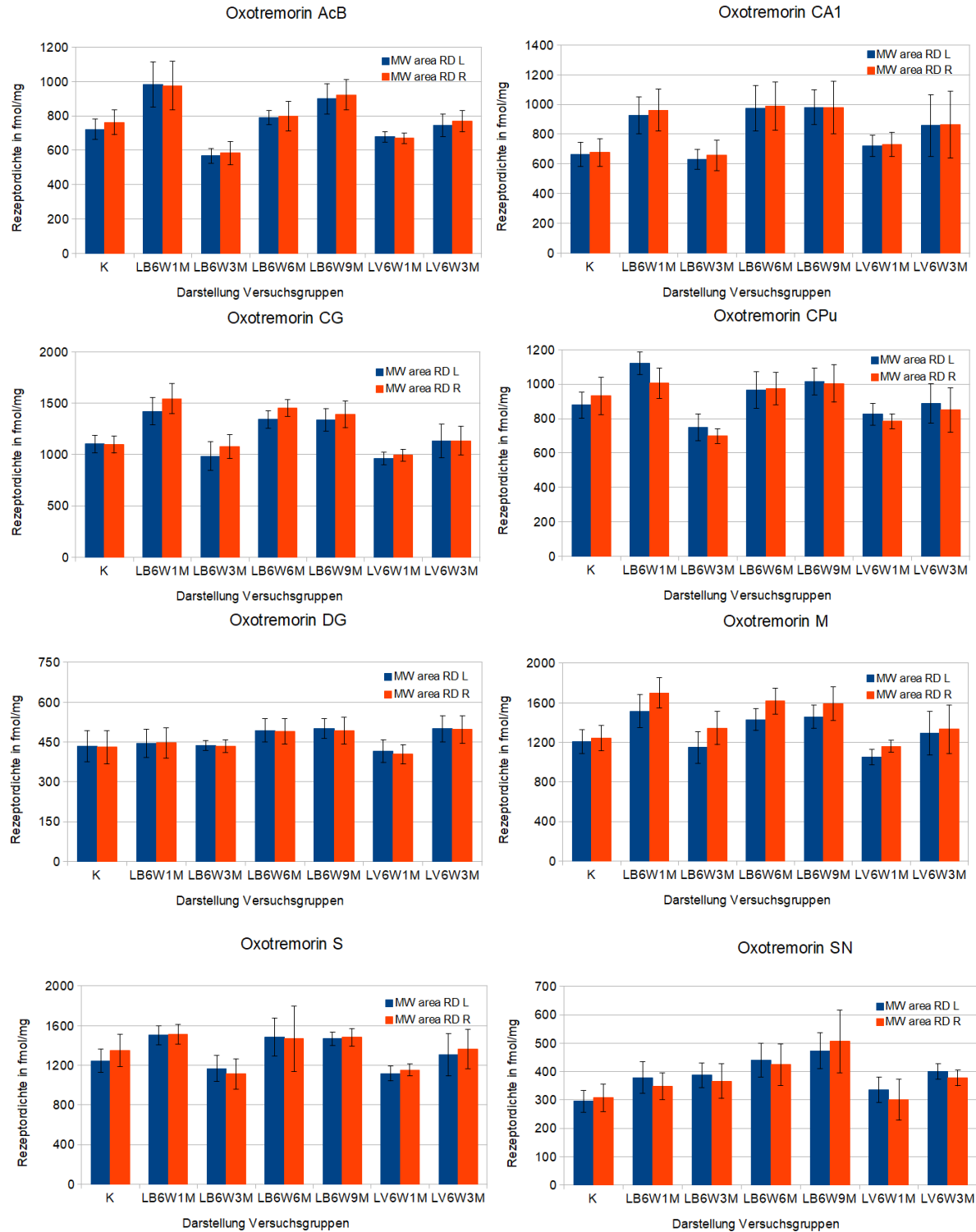


Abbildung 26: Darstellung der zeitlichen Veränderung der mittleren RD für den Ligand [^3H]-Oxotremorin des M_2 -Rezeptors

Zeitraum über 3-9 Monate für die Versuchsgruppen LB und LV an Hemiparkinson-Ratten für alle Hirnregion mit $\text{RD} > 200 \text{ fmol/mg}$. Die orangen Balken repräsentieren den MW der RD der rechten (läsionierten) Hemisphäre pro Fläche und die blauen Balken stellen den MW pro Fläche für die RD der linken Hemisphäre da.

Anhang

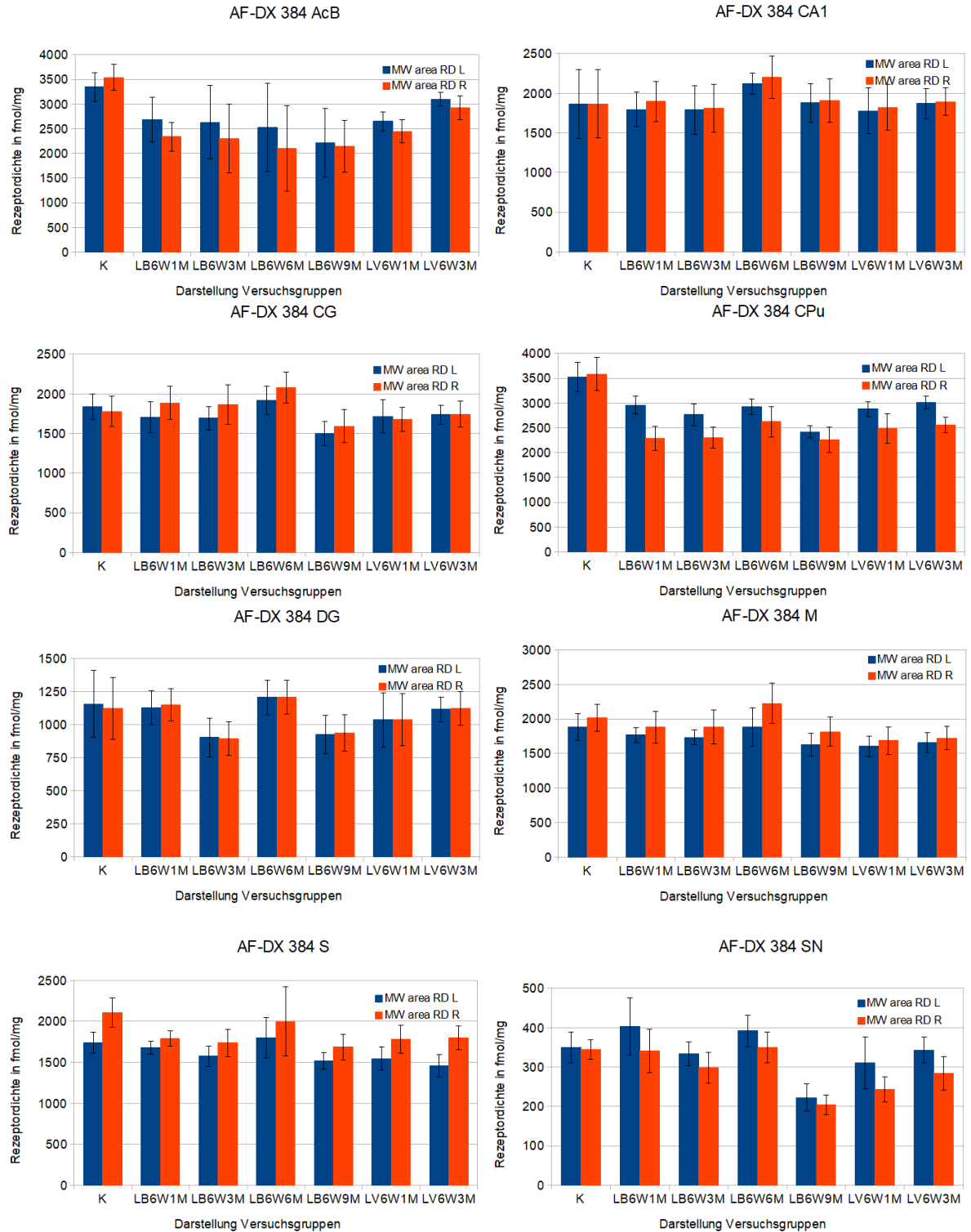
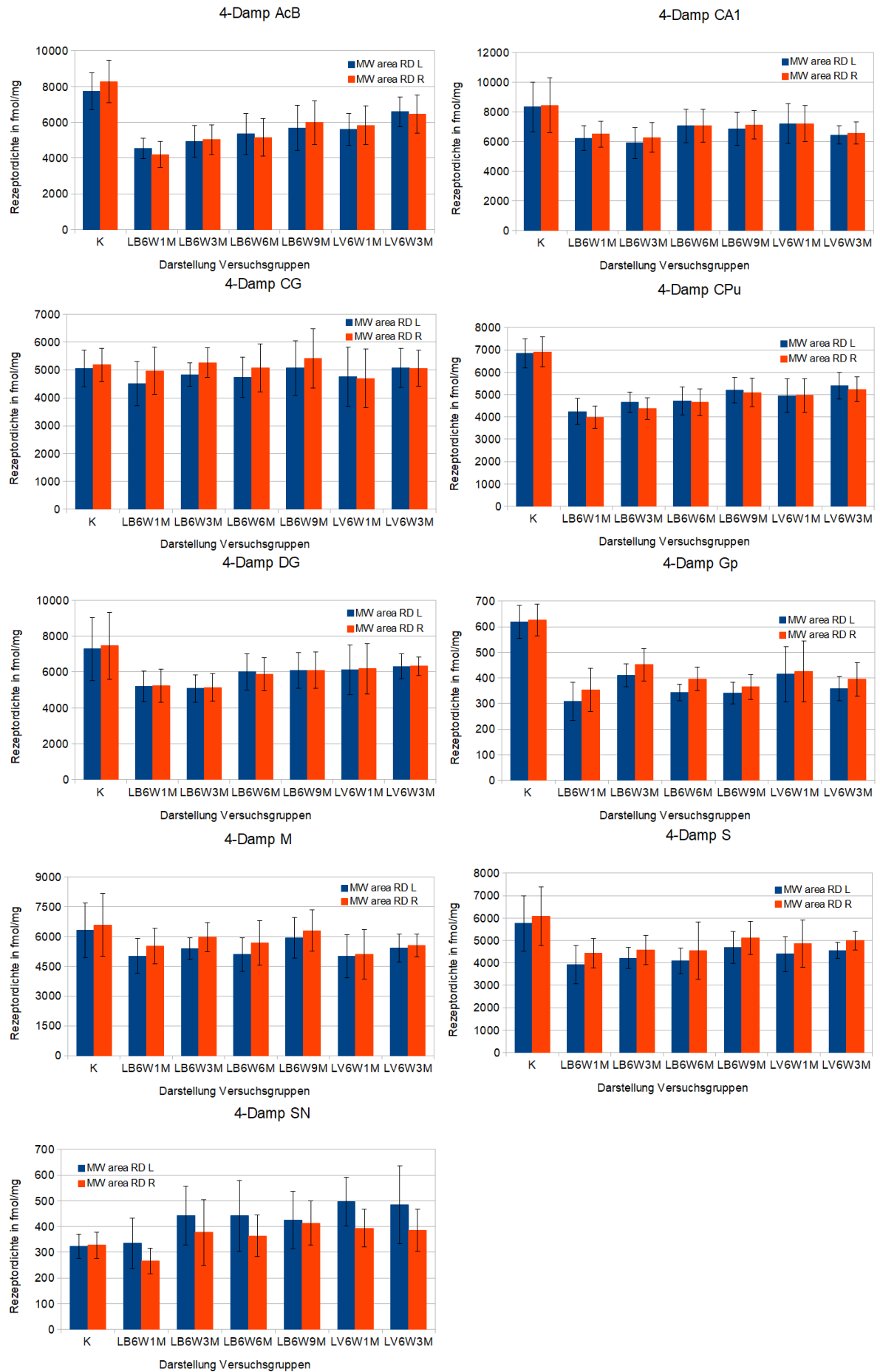


Abbildung 27: Darstellung der zeitlichen Veränderung der mittleren RD für den Ligand [^3H]-AF-DX-384 des M_2 -Rezeptors

Zeitraum über 3-9 Monate für die Versuchsgruppen LB und LV an Hemiparkinson-Ratten für alle Hirnregion mit $\text{RD} > 200 \text{ fmol/mg}$. Die orangen Balken repräsentieren den MW der RD der rechten (läsionierten) Hemisphäre pro Fläche und die blauen Balken stellen den MW pro Fläche für die RD der linken Hemisphäre da.

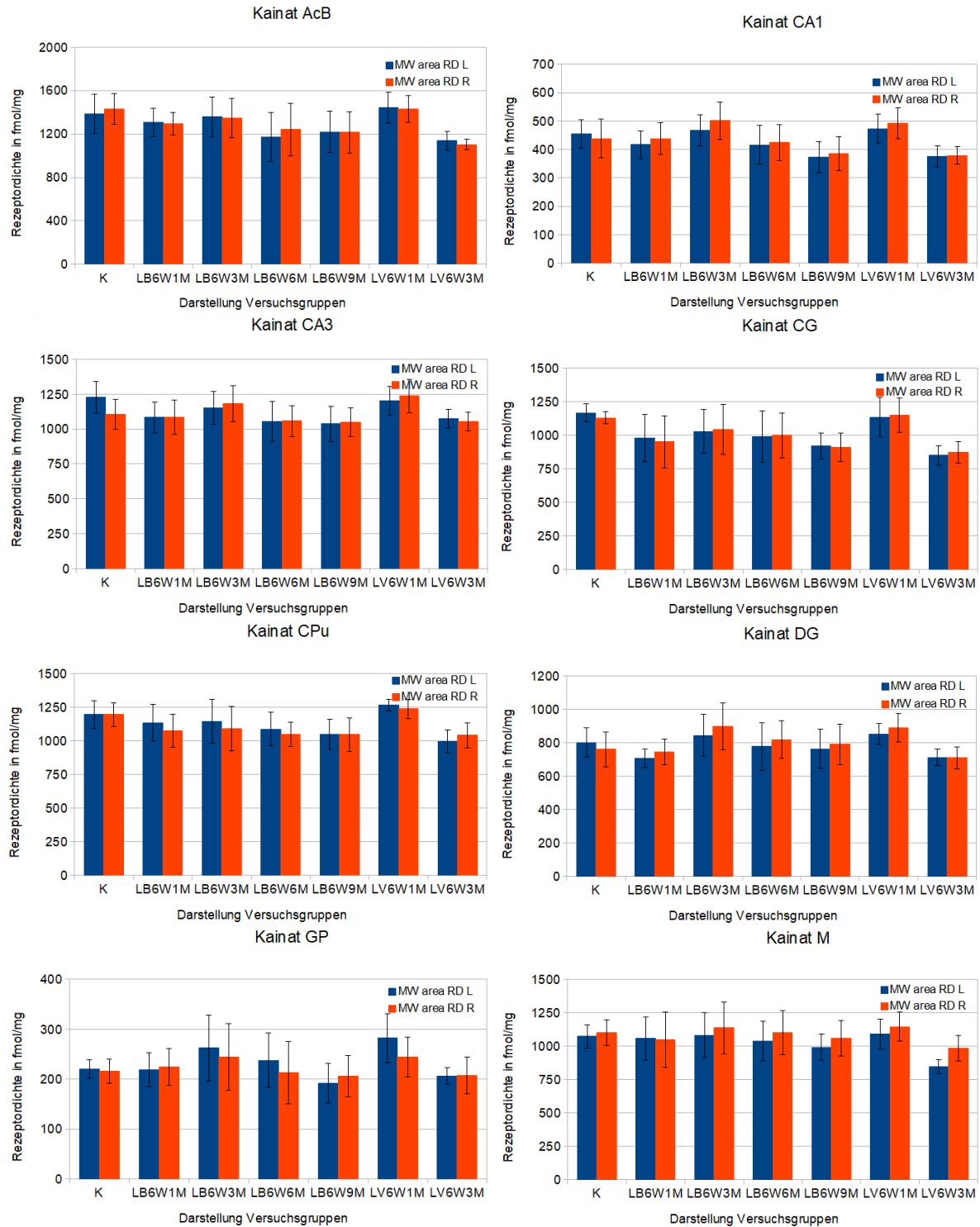
Anhang



Anhang

Abbildung 28: Darstellung der zeitlichen Veränderung der mittleren RD für den Ligand [^3H]-4-Damp des M_3 -Rezeptors

Zeitraum über 3-9 Monate für die Versuchsgruppen LB und LV an Hemiparkinson-Ratten für alle Hirnregion mit $\text{RD} > 200 \text{ fmol/mg}$. Die orangenen Balken repräsentieren den MW der RD der rechten (läsionierten) Hemisphäre pro Fläche und die blauen Balken stellen den MW pro Fläche für die RD der linken Hemisphäre da.



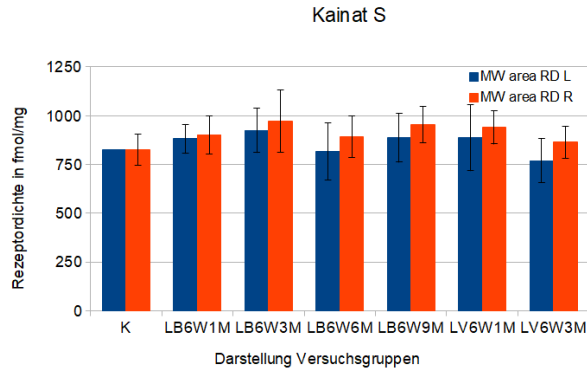
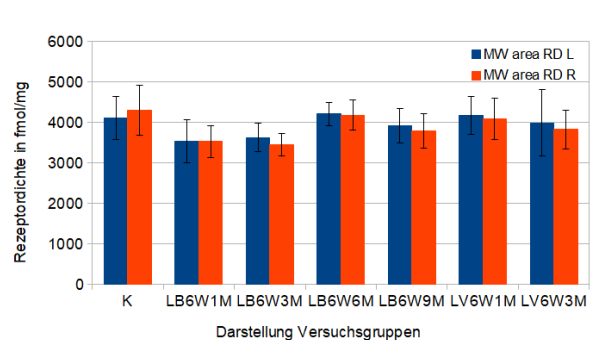
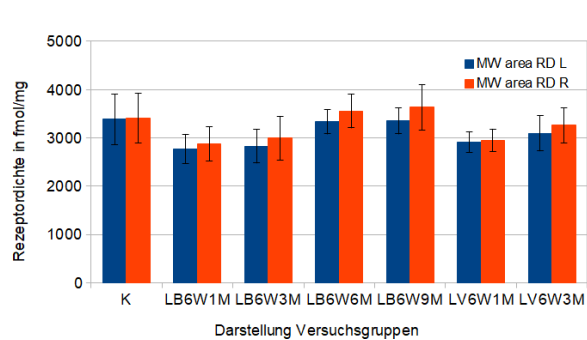
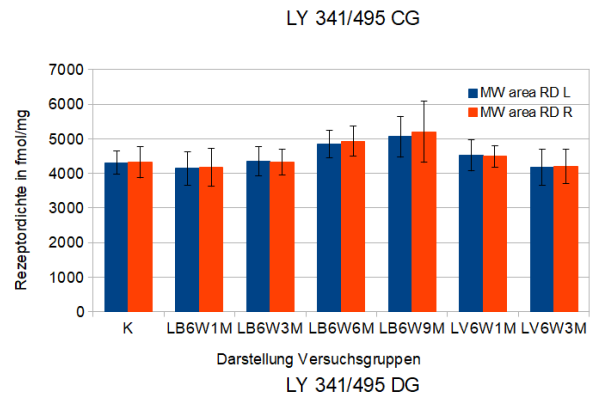
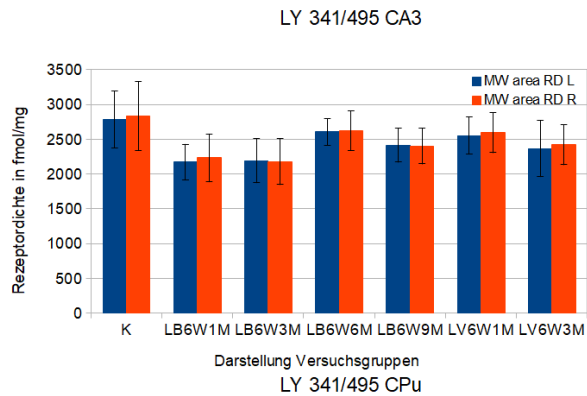
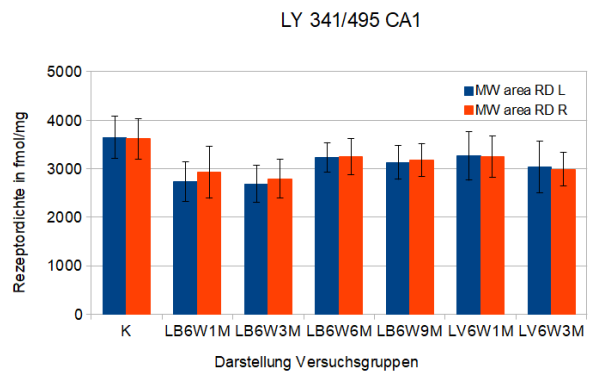
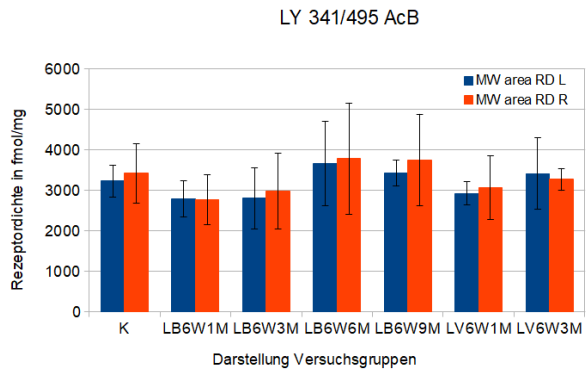


Abbildung 29: Darstellung der zeitlichen Veränderung der mittleren RD für den Ligand [^3H]-Kainat des Kainat-Rezeptors

Zeitraum über 3-9 Monate für die Versuchsgruppen LB und LV an Hemiparkinson-Ratten für alle Hirnregion mit RD > 200 fmol/mg. Die orangen Balken repräsentieren den MW der RD der rechten (läsionierten) Hemisphäre pro Fläche und die blauen Balken stellen den MW pro Fläche für die RD der linken Hemisphäre da.



Anhang

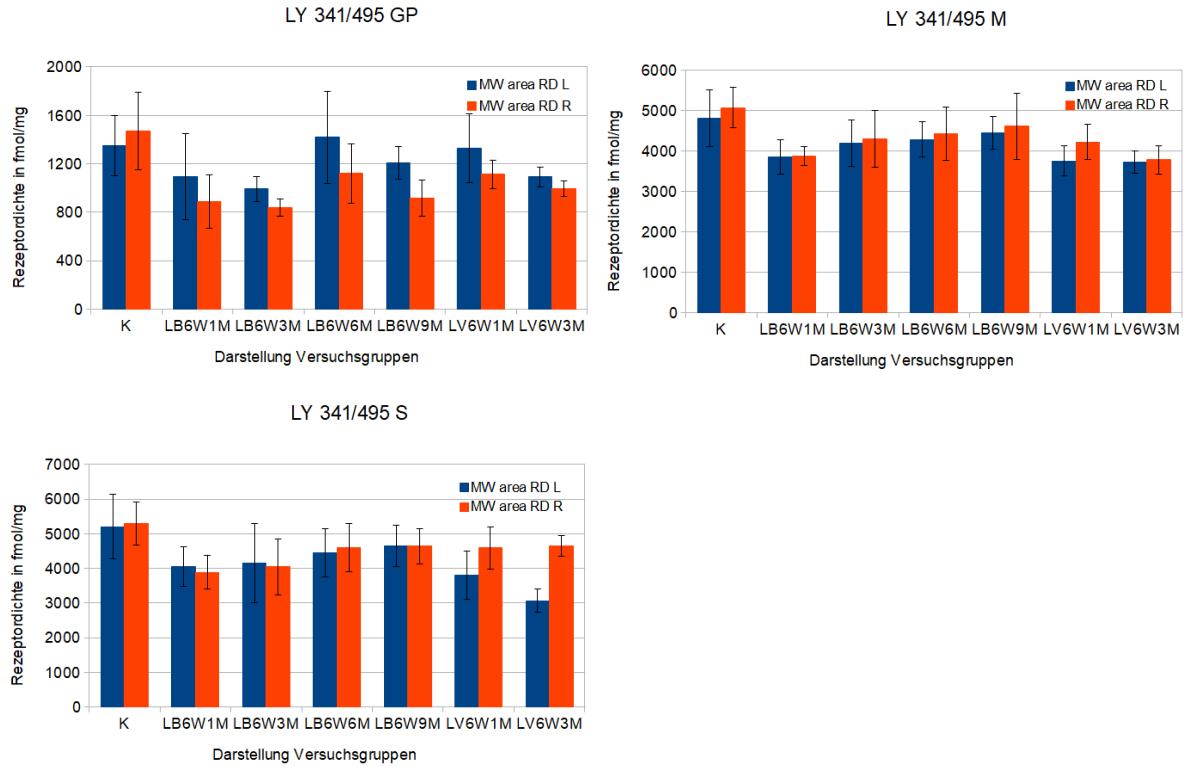
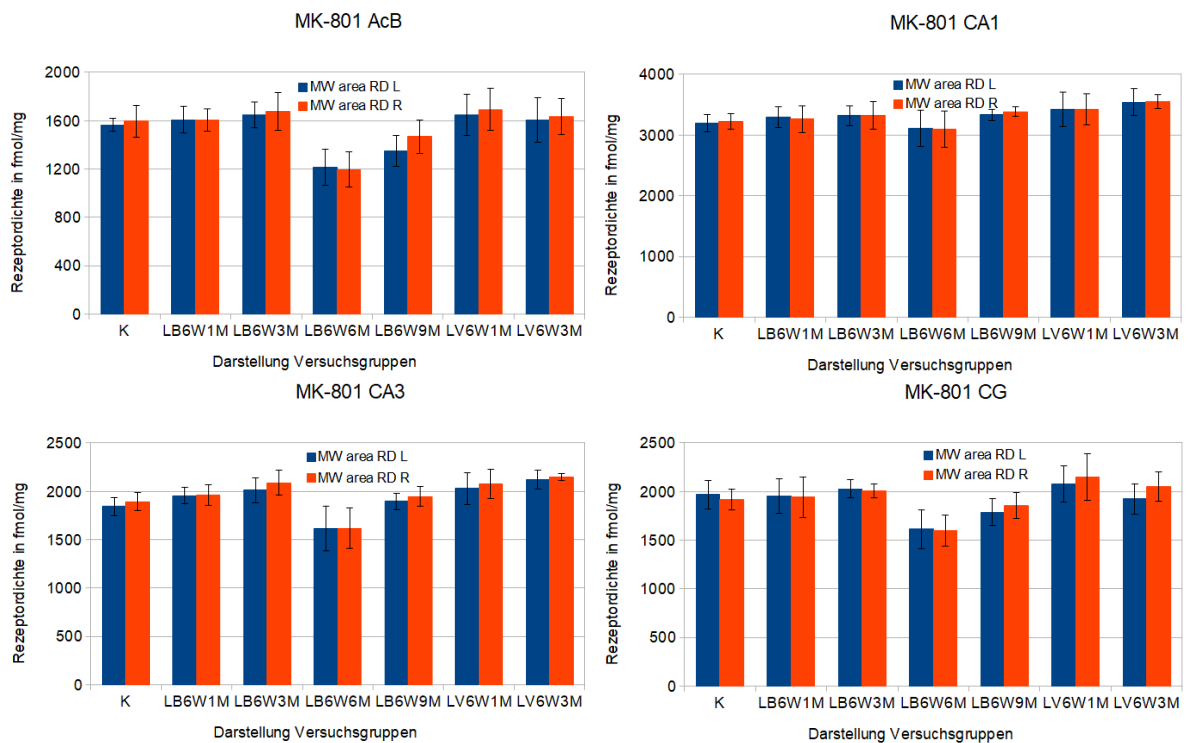


Abbildung 30: Darstellung der zeitlichen Veränderung der mittleren RD für den Ligand [3 H]-LY-341/495 des mGlu2/3-Rezeptors

Zeitraum über 36-9 Monate für die Versuchsgruppen LB und LV an Hemiparkinson-Ratten für alle Hirnregion mit RD > 200 fmol/mg. Die orangenen Balken repräsentieren den MW der RD der rechten (läsionierten) Hemisphäre pro Fläche und die blauen Balken stellen den MW pro Fläche für die RD der linken Hemisphäre da.



Anhang

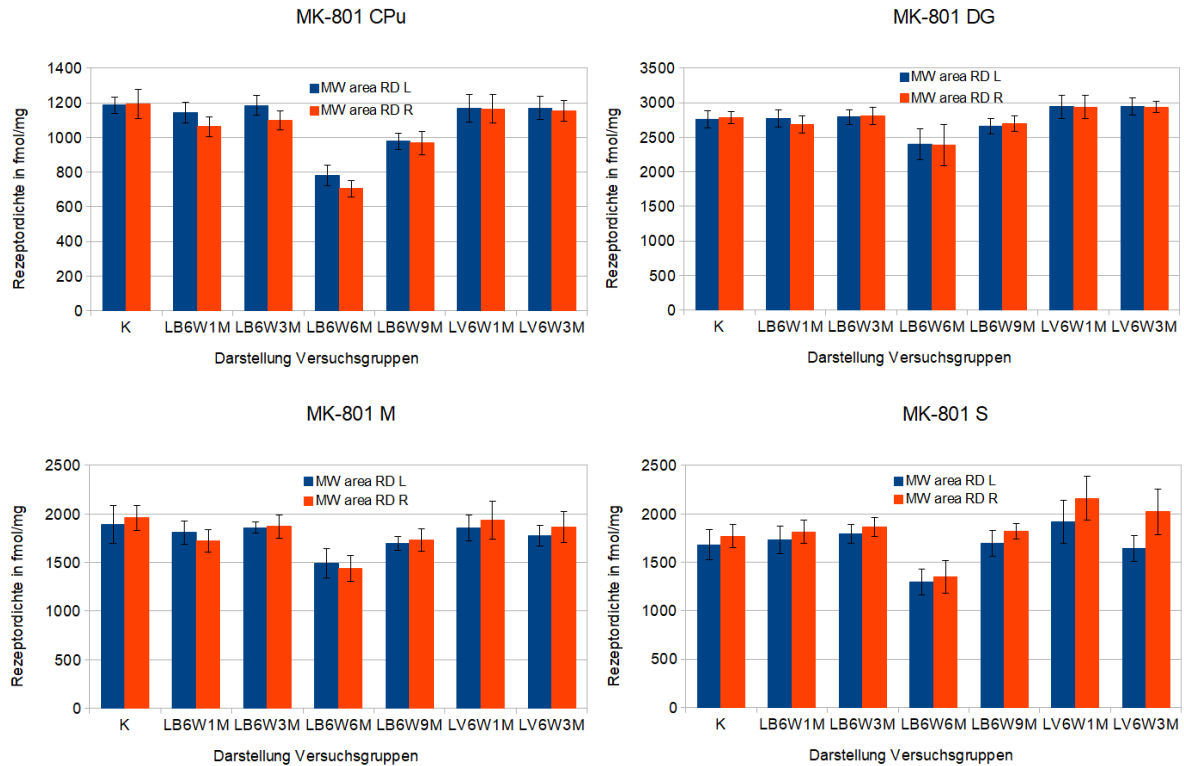


Abbildung 31: Darstellung der zeitlichen Veränderung der mittleren RD für den Ligand [^3H]-MK-801 des NMDA-Rezeptors

Zeitraum über 3-9 Monate für die Versuchsgruppen LB und LV an Hemiparkinson -Ratten für alle Hirnregion mit RD > 200 fmol/mg. Die orangen Balken repräsentieren den MW der RD der rechten (läsionierten) Hemisphäre pro Fläche und die blauen Balken stellen den MW pro Fläche für die RD der linken Hemisphäre da.

Erklärung

Ich gebe folgende Erklärung ab:

1. Ich versichere hiermit Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

2. Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsvorhaben ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen/Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistung für mich ganz oder teilweise erledigt.

Melanie Scheel

Rostock, den 20. Mai 2019

Thesen

1. Der idiopathische Morbus Parkinson (MP) ist eine häufige Erkrankung des Zentralnervensystems.
2. Ursachen für die motorischen und nicht-motorischen Störungen sind im Wesentlichen der ausgeprägte Verlust dopaminerger Neurone in der Substantia nigra pars compacta und der Hypercholinismus im Striatum.
3. Das 6-OHDA-Hemiparkinson-Modell der Ratte hat sich in der Grundlagenforschung bezüglich MP-bedingter Veränderungen bewährt. Veränderungen der Transmitter und ihrer Rezeptoren in umschriebenen Hirnarealen sind noch nicht abschließend geklärt.
4. Die Bestimmung der Dichten acetylcholinерger und glutamerger Rezeptoren in den unterschiedlichen Regionen der Basalganglienschleife und weiteren Hirnarealen mittels der *in vitro* Rezeptorautoradiographie sind Gegenstand dieser Studie.
5. Über einen möglichen Therapieansatz mit Botulinum-Neurotoxin-A (BoNT-A) bei intrastriataler Anwendung und dessen Effekt auf die verschiedenen Rezeptoren in unterschiedlichen Hirnarealen ist bisher wenig bekannt.
6. Für den nikotinischen Acetylcholinrezeptor wurde eine signifikante Reduktion der Rezeptordichte sowohl für die sham-BoNT (-50%) als auch für die BoNT-A (-45%) behandelten Hemiparkinson-Ratten im läsierten Caudatus-Putamen-Komplex und Nucleus accumbens gefunden.
7. Für die Dichte des Muskarin-1-Rezeptors wurden keine signifikanten Veränderungen sowohl für die sham-BoNT als auch für die BoNT-A behandelten Hemiparkinson-Ratten gefunden.
8. Für die Bindung des agonistischen und antagonistischen Liganden des Muskarin-2-Rezeptors wurden keine signifikanten Dichteveränderungen sowohl für die sham-BoNT als auch für die BoNT-A behandelten Hemiparkinson-Ratten gefunden.
9. Für die Dichte des Muskarin-3-Rezeptor wurden keine signifikanten Veränderungen sowohl für die sham-BoNT als auch für die BoNT-A behandelten Hemiparkinson-Ratten gefunden.
10. Für die Dichten der Glutamat-Rezeptoren (NMDA, Kainat und mGlu2/3) wurden keine signifikanten Veränderungen sowohl für die sham-BoNT als auch für die BoNT-A behandelten Hemiparkinson-Ratten gefunden.

Danksagung

"Ein kleines Wort - Danke - findet zu euch, weil große Worte für alles, was ich sagen möchte, zu klein sind dafür." *Monika Minder*

Mein Dank gilt als erstes dem besten Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Andreas Wree für das Angebot, meine Doktorarbeit am Institut für Anatomie schreiben zu können. Die Erarbeitung dieses noch weitgehend unangetasteten Themas war sehr lehrreich. Sehr zu schätzen war auch seine stets kurzfristige Verfügbarkeit für alle Probleme und auch seine vielen fachlichen Anregungen. Nicht zuletzt bewundere ich sein nach langen Jahren nicht weniger werdendes Interesse, neue Herausforderungen anzunehmen sowie die Begeisterung, die er für die Förderung des Nachwuchses in wissenschaftlichen Bereichen Tag für Tag zeigt.

Besonderer Dank gilt auch Frau M. Sc. Teresa Mann für ihre zahlreichen Hilfestellungen sowie ihre Geduld in der Einführung vieler Programme. Ich danke ihr sehr für die Hilfe bei statistischen Auswertungen und ihrer ständigen Verfügbarkeit bei allen Fragen und Problemen.

Mein Dank gilt auch dem Jülich-Institut und dabei besonders Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Karl Zilles für die gute Kooperation.

Weiterhin gilt besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Schmitt, für die umfassende Hilfe, Betreuung und Geduld im Umgang mit der verwendeten Software, der Datensichtung, der Diagrammerstellung und der statistischen Auswertung.

Auch gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Institutes, die an der Umsetzung der Experimente für diese Arbeit mitbeteiligt waren, für ihre gründliche und vorbildliche Arbeit.

Abschließend richte ich einen herzlichen Dank an meinen Eltern, meiner Schwester sowie an meinem Freund und seiner Familie für den Zuspruch und die ständige Unterstützung im Verlaufe des Studiums.

Lebenslauf

Name: Melanie Scheel
Geburtsdatum: 07. Oktober 1995
Geburtsort: Pritzwalk
Adresse: Buxtehuder Straße 14, 18311 Ribnitz-Damgarten
Familienstand: ledig
Kontakt: scheel_melanie@web.de

Schulausbildung:

2002-2008 Grundschohle in Heiligengrabe
2008-2014 Johann-Wolfgang-von-Goethe-Gymnasium in Pritzwalk

Beruflicher Werdegang:

2014-2019 Studium der Zahnmedizin an der Medizinischen Fakultät der
Universität Rostock, Staatsexamen: 10.2019
Seit 2020 Vorbereitungsassistentin in niedergelassener Zahnarztpraxis

Promotions- und Forschungsarbeit:

experimentelle Forschungsarbeit am Institut für Anatomie, Arbeitsgruppe Neuroanatomie, der
Universität Rostock in Zusammenarbeit mit dem Forschungszentrum Jülich

Leiter und Betreuer: Prof. Dr. med. A. Wree